

**Modulierende Effekte des
Spurenelementes Selen
auf die differentielle Genexpression
in stimulierten mononukleären Zellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Lars Berbig

geboren am 8. Mai 1976 in Naumburg/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. M. Bauer, Jena
2. PD Dr. I. Rubio, Jena
3. Prof. Dr. R. Kinscherf, Marburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2011

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
------------------------------	---

ZUSAMMENFASSUNG	V
------------------------	---

1. EINLEITUNG	1
----------------------	---

1.1. Inflammation	1
-------------------	---

1.2. Inflamationsreaktion	2
---------------------------	---

1.3. SIRS, Sepsis und septischer Schock	2
-----------------------------------------	---

1.4. Pathophysiologie	3
-----------------------	---

1.5. Inflammation und Gerinnung	5
---------------------------------	---

1.6. Inflammation und Komplementsystem	6
----------------------------------------	---

1.7. Inflammation und oxidativer Stress	7
-----------------------------------------	---

1.8. Oxidativer Stress und antioxidatives Schutzsystem	8
--------------------------------------------------------	---

1.9. Selen als Antioxidans	9
----------------------------	---

2. ZIEL- UND AUFGABENSTELLUNG	12
--------------------------------------	----

3. MATERIAL UND METHODEN	14
---------------------------------	----

3.1. Material- und Geräteliste	14
--------------------------------	----

3.2. Zellisolation/ Zellpräparation	16
-------------------------------------	----

3.3. Zellkultur und Stimulation	17
---------------------------------	----

3.4. RNA – Aufarbeitung	18
-------------------------	----

3.4.1. Qualitätskontrolle mittels Elektrophorese & Spektrophotometrie	19
-----------------------------------------------------------------------	----

3.5. Microarray-Experiment	21
----------------------------	----

3.5.1. PCR-Verifizierung	23
--------------------------	----

3.5.2. Auswertung und Normalisierung	25
--------------------------------------	----

3.5.3. Statistische Auswertung	26
--------------------------------	----

3.6. Reverse Transkription (RT)	26
---------------------------------	----

3.7. Polymerase–Kettenreaktion (PCR)	27
--------------------------------------	----

3.7.1. Elektrophorese	28
-----------------------	----

3.7.2. Auswertung	29
-------------------	----

3.8. Promoteranalyse	29
----------------------	----

4. ERGEBNISSE	31
4.1. Auswertung des Microarray- Experiments	32
4.1.1. Unterschiede in der Expressionsrate	35
4.1.2. Validierung der Genexpressionsdaten zum Microarray- Experiment mittels semiquantitativer PCR	38
4.2. Promotoranalyse mittels <i>MatInspector</i>	40
4.2.1. Bestätigende semiquantitative RT-PCR zur Promotoranalyse	42
5. DISKUSSION	44
5.1. Durchführung von Genexpressionsanalysen mittels Microarray–Technologie	47
5.2. Interpretation der Expressionsanalysen	
5.2.1. Differentielle Genexpression in mononukleären Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren	50
5.2.2. Differentielle Genexpression in mononukleären Zellen nach Präinkubation mit Selenit und Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren	51
5.3. Promotoranalyse – Hinweise zur Regulation der Transkription	52
5.4. Regulation der Transkription	53
5.5. Anwendung der Ergebnisse im Tierexperiment	55
5.6. Andere Antioxidantien im klinischen Einsatz	56
6. SCHLUSSFOLGERUNG	58
7. LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS	59
8. ANHANG	
GENLISTE (AUSFÜHRLICH)	
SEPSISKRITERIEN	
BEISPIEL PROMOTERANALYSE	
DANKSAGUNG	
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	
LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACCP	American College of Chest Physicians
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	copy DNA
CRP	Capsel-Reaktives Protein
DIC	Disseminierte intravaskuläre Gerinnung
DNA	Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure
DSG	Deutsche Sepsis Gesellschaft
EGDT	Early Goal-Directed Therapy
ELAM-1	endothelial adhesion molecule 1
HMG 1	High Mobility Group 1
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1B	Interleukin-1B
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
ISF	International Sepsis Forum
LPS	Lipopolysaccharid
MIF	Macrophage Migration Inhibitor Factor
MIP	Major intrinsic protein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NFκB	Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B-Cells
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	1. nitrogen oxygen species, 2. NO-Synthase
OD	Optische Dichte
PAF	Platelet-activating factor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns

PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern Recognition Receptor
p-Wert	probability-value (Signifikanzniveau)
RNA	Internationale Bezeichnung für Ribonukleinsäure,
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ("reactive oxygen species")
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschl. Polymerasekettenreaktion
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SEPNET	Kompetenznetzwerk Sepsis
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSC	Surviving Sepsis Campaign
RPMI 1640	Zellkulturmedium (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
VCAM-1	Vascular Cell Adhäsionsmolekül-1

Untersuchte Se-sensitive Gene, Promoteranalyse

ALOX5AP	arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
ATP2B1	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 1
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3
CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
FLOT1	Flotilin 1
ICAM1	intracellular adhesion molecule 1
IgL1	immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
IL1B	Interleukin 1 beta
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)
IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
IL26	interleukin 26
JUNB	jun B proto-oncogene
LAMR1	= RPSA, ribosomal protein SA
MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12
MAP3K14	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
NFATC2	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PLA2G12	phospholipase A2, group XIIA
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTX3	pentraxin 3, long
TNFRSF4	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
TLR3	toll-like receptor 3

Untersuchte *housekeeping* Gene, Promoteranalyse

ACTB	actin, beta
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
B2M	beta-2-microglobulin
CANX	calnexin
CD4	CD4 molecule
ESD	esterase D
G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H3F3A	H3 histone, family 3A
HMBS	hydroxymethylbilane synthase
HNRPC	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
KARS	lysyl-tRNA synthetase
LDHA	lactate dehydrogenase A
NCAM	neural cell adhesion molecule 1
PHK1	sphingosine kinase 1
PSMD2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2
PTDSS1	phosphatidylserine synthase 1
RPL11	ribosomal protein L11
RPS3	ribosomal protein S3
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
TCEA1	transcription elongation factor A (SII), 1
TCFL1	=VPS72, vacuolar protein sorting 72 homolog (S. cerevisiae)
VIM	vimentin

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Spurenelementes Selen auf die inflammationsrelevante Genexpression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) untersucht.

Im Rahmen der Pathogenese der Systemischen Inflammationsreaktion werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet, wobei die antioxidative Kapazität sich aufgrund eines unter diesen Umständen manifestierenden Selenmangels als erschöpflich präsentiert. Dieses Epiphänomen korrelierte invers mit dem Schweregrad in Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock. In Studien, welche größtenteils monozentrisch in kleinen Kohorten durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass eine Selensubstitution einen positiven Einfluss auf die Mortalität aufweist. Aufgrund der unvollständigen Datenlage liegt keine Empfehlung zur Selensubstitution vor, das Verständnis des zu Grunde liegenden Pathomechanismus ist lückenhaft.

Um den Einfluss von Selen auf das Genexpressionsmuster als früh nachweisbare Stressantwort näher zu charakterisieren, wurden für ein *ex-vivo*-Modell PBMC aus gesunden Probanden isoliert und kultiviert. Nach ihrer Präinkubation mit Selenit zur intrazellulären Anreicherung des Spurenelements wurden die Zellen mit den prototypischen pro-inflammatorischen Mediatoren LPS und TNF- α stimuliert, die RNA wurde isoliert und anschließend mittels Microarray-Analyse die Genexpressionsprofile erstellt.

Als ein wesentliches Ergebnis konnte ein charakteristisches, durch Selen modulierte Genexpressionsmuster herausgearbeitet und mit unabhängigen Methoden bestätigt werden. Da sich darüber hinaus Hinweise auf eine Selen-abhängige Regulation der Transkription ergaben, schloss sich eine *in-silico* Betrachtung möglicher Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im Promoterbereich ausgewählter, spezifisch reagierender Gengruppen an. Die aus der vergleichenden Analyse der Promoterregionen von unveränderten und Selen-sensitiven Genen nach proinflammatorischer Stimulation resultierenden Daten konnten mittels semiquantitativer RT-PCR ebenso validiert werden und unterstützen die Hypothese eines unmittelbaren Einflusses von Selen auf die Transkriptionsaktivität nach proinflammatorischer Stimulation.

1. EINLEITUNG

Trotz enormer Fortschritte im Verständnis der molekularen Mechanismen und ihrer unterstützenden Therapien stellen akute entzündliche Erkrankungen in den vielfältigsten Erscheinungsformen ein bedeutendes medizinisches und wissenschaftliches Problem dar. Das Auftreten septischer Krankheitsbilder nahm in den letzten Jahren kontinuierlich zu und stellt inzwischen eine der Haupttodesursachen bei nicht - kardiologischen Intensivpatienten dar. Aktuell treten ca. 52.000 bis 75.000 Fälle mit schwerer Sepsis jährlich auf, dass heißt, dass ca. 76 -110 von 100 000 Einwohnern pro Jahr in Deutschland an einer Sepsis erkranken, ca. jeder Dritte verstirbt an dieser Erkrankung bzw. an deren Folgen. Damit stellt die Sepsis die dritt-häufigste Todesursache in Deutschland dar. (Engel et al., 2007)

Neue Therapieansätze und die Aufklärung intrazellulärer Mechanismen der Zellaktivierung, der Signaltransduktion sowie antiinflammatorischer und antioxidativer Prozesse rückten daher in den vergangenen Jahren immer mehr in den Mittelpunkt interdisziplinärer Anstrengungen.

1.1. INFLAMMATION

Die Inflammation stellt *per se* zunächst eine physiologische Immunreaktion des Organismus auf einen proinflammatorischen Reiz dar. Sie ist bei regelrechter Abwehrlage sowohl temporär als auch lokal begrenzt.

Die Kardinalzeichen der Entzündung äußern sich klinisch durch *Rubor*, *Calor*, *Dolor*, *Tumor* sowie *Funktio laesa* und wurden bereits von Celsus (25 v.- 50 n. Chr.) erkannt und beschrieben.

Pathophysiologisch werden durch einen Reiz oder Noxen ausgehend von Bakterien, Viren, Pilzen Verbrennungen, Operationen oder Traumen, verschiedene Kaskaden im Organismus ausgelöst, um letztlich eine *Restitutio ad integrum* zu erreichen. Dabei spielen pro- und antiinflammatorische Mediatoren wie Zyto- und Chemokine, Interferone, Adhäsionsmoleküle, reaktive Sauerstoffspezies etc. eine wichtige Rolle.

1.2. INFLAMMATIONSREAKTION

Aus der initial lokalen Entzündungsreaktion können die sich über die Blutbahn verteilenden Mediatoren zu einer systemischen Inflammation führen, besonders bei einem bereits geschwächten Organismus, sei es durch Vorerkrankungen, Alter oder die genetische Prädisposition, invasivere Operationstechniken, Traumata sowie Resistenzen gegenüber Antibiotika oder Veränderungen im Spektrum und der Pathogenität mikrobieller Erreger. Aus einem Kontinuum dieser ablaufenden generalisierten Reaktion kann sich ein sogenanntes systemisches Inflammationsreaktionssyndrom (SIRS), eine Sepsis bis hin zum septischen Schock mit einem Multiorganversagen entwickeln. Klinisch lassen sich diesen Krankheitsbildern keine spezifischen Symptome zuordnen. Den klinisch tätigen Ärzten erschweren diese Umstände die möglichst frühe Diagnosestellung. Diese ist aber wiederum für eine frühzeitige adäquate Therapie und den Krankheitsverlauf (*outcome*) des Patienten sehr entscheidend. (Reinhart u. Brunkhorst, 2002)

Rivers et al. berichtete in einer Studie, dass durch eine schnelle adäquate Volumentherapie in Form einer verbesserten intensivmedizinischen Behandlung ein günstigerer Krankheitsverlauf (besseres *outcome*) erreicht werden konnte. (Rivers et al., 2001) Angewandt wurden hierfür die Basistherapiemethoden: Herdsanierung, kausale, adjuvante (adjunktive) sowie supportive Therapiemaßnahmen. Die von Rivers et al. betrachtete Kohorte unterschied sich jedoch in der Schwere der septischen Erkrankungen von dem in Deutschland untersuchten Patientengut darin, dass die Patienten mit einer bereits differenzierten Diagnose aufgenommen wurden.

1.3. SIRS, SEPSIS UND SEPTISCHER SCHOCK

Bone publizierte 1989 eine moderne Definition der Sepsis, die besagt: „Sepsis ist eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom und die Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ (Bone et al., 1989) In der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicans und der Society of Critical Care Medicine* wurde 1991 diese Definition weitergefasst und

ein Kriterienkatalog für die Diagnosestellung der Sepsis erarbeitet. Die Einstufung und Zuordnung sind im Anhang der vorliegenden Arbeit tabellarisch erfasst. Danach werden das systemische Inflamationsreaktionssyndrom (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock unterschieden, welche auch als Krankheitskontinuum angesehen werden.

1.4. PATHOPHYSIOLOGIE

Das systemische Inflamationsreaktionssyndrom (SIRS) als multifaktorielles pathophysiologisches Geschehen stellt sich als ein sehr komplexes Krankheitsbild dar.

Die Initiierung der Wirtsreaktion erfolgt durch sogenannte *Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)*. Dies können zum einen Oberflächenmoleküle wie z.B. LPS, Lipoteichonsäuren, Lipoproteine, Flagelline sowie Peptidoglykane sein, aber auch interne Signale, beispielsweise DNA-Fragmente von Bakterien und *Heat-shock Proteine*, zählen dazu. Diese werden wiederum von intrazellulären *Pattern Recognition Receptors (PRRs)* immunkompetenter Zellen erkannt. Medhiztov et al. beschrieb verschieden wirkende Rezeptoren, einerseits lösliche, z.B. Mannose-Binding Lectin (MBL) und Ficolin, andererseits endozytierende Mannoserezeptoren und signaltransferierende Toll-like Rezeptoren (TLRs) nachgewiesen. (Medhiztov u. Janeway, 2000)

Eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der Signaltransduktion spielen die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Bisher sind zehn Rezeptoren dieser Art bekannt. Sie stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. So erkennt beispielsweise der Toll-like Rezeptor-4 (TLR 4) das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Kommt es zur Bindung an den Rezeptor wird durch den intrazellulären Anteil die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Interferonen über die NF- κ B- Freisetzung ausgelöst. So werden u.a. TNF- α , Interleukin(IL)-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, MIF und HMGB-1 freigesetzt. Dadurch kommt es zur Aktivierung neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Endothelzellen sowie zur Induktion von Akutphasenproteinen und Adhäsionsmolekülen sowie der Bildung und Freisetzung reaktiver NOS. Durch Chemokine, wie z. B. IL-8, MIP,

MCP-1 werden Granulozyten und Makrophagen mobilisiert und aktiviert. Über Lipidmediatoren, beispielsweise den *Platelet-activating factor* (PAF) Prostaglandine, Thromboxan und *tissue factor* werden Endothelzellen und die Gerinnungskaskade aktiviert. Zudem wird die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert, deren antimikrobieller und signalübertragender Wirkung eine wesentliche Rolle bei der Abwehrreaktion zugeschrieben wird. (Weigand et al., 2000)

Im Netzwerk der zahlreichen Mechanismen während einer Entzündungsreaktion werden sowohl gleichzeitig als auch mit Verzögerung antiinflammatorische Zytokine (TNF- β , IL-10, IL-13 u. a.) freigesetzt. Diese stehen mit den proinflammatorischen Mediatoren in einem Gleichgewicht mit dem Ziel, die aus der übermäßigen Aktivierung des Immunsystems resultierende immunologische Imbalance auszugleichen. Bei einer überschießenden Reaktion, die von der Stärke des Stimulus, seiner Persistenz und letztlich auch der vorbestehenden Schwächung des betroffenen Organismus und seiner vitalen Funktionen abhängig ist, kann sich eine Imbalance der immunologischen Homöostase mit gravierenden und limitierenden Folgen wie z. B. dem akutes Organversagen einstellen.

Die Gruppe um Weigand beschrieb sowohl Phasen der Hyperinflammation als auch der Immunsuppression als Konsequenz der immunologischen Dysbalance. Die Phase der Hyperinflammation ist durch das Überwiegen proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α , Interleukin(IL) IL-1 β , IL-6 und IFN- γ gekennzeichnet. Ebenfalls in dieser Phase werden vermehrt Sauerstoffradikale und Proteasen durch aktivierte neutrophile Granulozyten freigesetzt. In Stadien der Immunsuppression lassen sich vorwiegend antiinflammatorische Mediatoren und lösliche Zytokinrezeptoren beispielsweise IL-10, IL-4, sTNF- α RI und II sowie sIL-1Ra) nachweisen, zudem besteht die Gefahr von Sekundärinfektionen. Durch die systemische Verbreitung der Mediatoren kommt es bei der systemischen Inflammation an nicht ursprünglich betroffenen Lokalisationen zu Gewebeschäden bis hin zum Gewebeuntergang. Nekrotisches Gewebe kann dann letztlich wieder Auslöser einer Inflammationsreaktion sein und die bereits ablaufende Reaktion weiter unterhalten oder gar intensivieren. Letztlich werden u.a. immer mehr reaktive

Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt, die die Inflamationsreaktion des Organismus weiter anregen und den „oxidativen Stress“ verstärken.

Zusammenfassend kann zunächst gesagt werden, dass es bei der Initiierung der Wirtsantwort zur Induktion proinflammatorischer Signalwege, Aktivierung der Blutgerinnung und des Komplementsystems sowie zur Opsonisierung, der Markierung von Antigenen und Phagozytose kommt. (Riedemann et al., 2003; Bauer et al., 2006)

1.5. INFLAMMATION UND GERINNUNG

Ein entscheidender Fortschritt war u.a. die Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen der Antwort des Organismus auf generalisiert entzündliche Reaktionen und der gegenseitigen Beeinflussung mit dem Gerinnungssystem, inklusive Hämostase und Fibrinolyse. (Opal u. Esmon, 2003). Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung der Blutgerinnung. Sie stellt damit eine essentielle physiologische Abwehrreaktion auf eindringende Mikroorganismen oder deren Toxine dar. Kommt es dabei aber zu einer unverhältnismäßigen überschießenden Aktivierung, kann dies klinisch zu relevanten Problemen führen und letztlich die Prognose der Erkrankung negativ beeinflussen. Levi et al. sowie Esmon belegten die modulierenden Einflüsse des Gerinnungssystems auf die Immunantwort (Levi et al., 1997 u. 1999; Esmon, 2005). Durch aktivierte Thrombozyten (Levi et al., 2004) sowie Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) (Coughlin, 2000) kommt es dabei zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies. (Levi et al., 2004)

Eine weitere wesentliche Rolle in der Ätiologie des SIRS wird der Aktivierung der Endothelzellen zugeschrieben. (Henneke u. Golenbock, 2002) Dabei stehen strukturelle und funktionelle Veränderungen des Endothels im Vordergrund, u.a. kann sich eine zunehmende Gefäßpermeabilität (Aird, 2003, Laudry u. Oliver, 2001) einstellen sowie eine pro-koagulatorische Endothel-Oberfläche ausbilden. (Bombeli et al., 1997)

Des Weiteren stellt im Zusammenspiel zwischen Inflammation und Gerinnungssystem der *Tissue Factor* eine wesentliche Rolle dar. Die

Freisetzung erfolgt einerseits durch die endotheliale Dysfunktion im subendothelialen Gewebe, andererseits durch die Zytokinwirkung aus Mono- und Thrombozyten. (Camerer et al., 1996; Osterud, 1998)

1.6. INFLAMMATION UND KOMPLEMENTSYSTEM

Paul Ehrlich beschrieb bereits 1890 eine Gruppe von Proteinen im Blut und auf Zelloberflächen, welche zur antikörper-vermittelten Immunität zur Verfügung stehen. Aus der heutigen Sicht ist das Komplementsystem ein zentraler Teil der angeborenen Immunität und dient der Abwehr von Pathogenen. Es steht in enger Wechselbeziehung mit der Gerinnungskaskade und spielt bei Inflammationsprozessen eine wichtige Rolle. Markiewski et al. untersuchte die Zusammenhänge zwischen Inflammation und der Aktivierung des Komplementsystems und stellte dabei fest, dass das Komplementsystem im Zusammenspiel zwischen den Abwehr- und Entzündungsmechanismen als wichtiges Bindeglied und nicht nur als „Bakterienkiller“ betrachtet werden sollte. (Markiewski et al., 2007)

Ebenfalls durch Markiewski et al. wurde das Netzwerk zwischen Hämostase und Komplementsystem betrachtet. Dabei wurde dargelegt, dass beide proteolytischen Kaskaden durch die gleichen Stimuli aktiviert werden, z.B. durch Infektionen oder Gewebsschädigung und u.a. durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. In ihrem Wirken sollten beide Systeme lokal begrenzt bleiben, zudem bestehen direkte Wechselwirkungen zwischen beiden Kaskaden. (Markiewski et al., 2007) Dabei ist festzuhalten, dass das Komplementsystem ebenfalls pro - koagulatorische Eigenschaften besitzt. So werden durch die Umwandlung von Komplement C3 in C3a Plättchen aktiviert; C5a bewirkt u. a. eine verstärkte Expression des *Tissue factors* auf Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten.

1.7. INFLAMMATION UND OXIDATIVER STRESS

In den aktivierten Abwehrzellen (Makrophagen, Monozyten, Neutrophile und Lymphozyten) werden durch exogene Mediatoren, wie z.B. bei Infektionen durch gramnegative Bakterien freigesetztes LPS, neben einer Reihe von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren auch in erhöhtem Maße zytotoxische Substanzen, u.a. vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, im Rahmen der Immunantwort gebildet und freigesetzt („*respiratory burst*“).

Diese hochreaktiven Sauerstoffradikale sind u.a. Bestandteil der unspezifischen Abwehr und regen die Bildung von Interleukinen an, jedoch können sie aufgrund ihrer Eigenschaften zur Schädigung von Membranen, der Lipidperoxidation und damit zum Integritätsverlust von Gewebestrukturen führen. Einen wesentlichen Einfluss üben dabei die reaktiven Sauerstoffradikale auf die Endothelzellen aus, die aktiviert werden und dadurch vermehrt Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1, ELAM-1 produzieren. Zudem führt die Endothelzellaktivierung unter anderem auch durch eine Schuppung des Endothels zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems und kann zum *Capillary Leak Syndrom* führen. Dabei kommt es durch die erhöhte Permeabilität der Gefäße zu einer unkontrollierten Volumenverschiebung in das Interstitium, mit resultierenden (generalisierten) z.T. massiven Ödemen und einer Kreislaufdysregulation und -funktion. Aufgrund der Hämokonzentration werden die rheologischen Eigenschaften ungünstig beeinflusst, so dass die Neigung zur intravasalen Thrombenbildung steigt, es konsekutiv zu Perfusions-inhomogenitäten und zur Minderperfusion von Organen kommt. Mikrozirkulationsstörungen mit resultierender Gewebehypoxie und entsprechenden pathophysiologischen molekularen Reaktionen, auch hier sei wieder die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies genannt, sind die Folge und leisten einem Organversagen weiteren Vorschub. Der erhöhte unkontrollierte Konsum an plasmatischen Gerinnungsfaktoren führt im Verlauf und unter Verbrauch der Thrombozyten zu einer Verbrauchskoagulopathie, die sich klinisch durch multiple Blutungen der Haut und Schleimhäute, z.B. gastrointestinale Blutungen, manifestiert. (Dempfle u. Borggrefe, 2006)

Durch die hohe Reaktionsfähigkeit der ROS werden intrazelluläre Prozesse ausgelöst. Bei überschießender Produktion der Sauerstoffradikale oder

Erschöpfung der antioxidativen Kapazität können wie oben gezeigt durch die Radikalbildung fatale Folgen für den Organismus resultieren. Alle dargestellten Reaktionen und Vorgänge laufen bei der Inflamationsreaktion parallel ab und unterhalten sich gegenseitig.

1.8. OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDATIVES SCHUTZSYSTEM

Im menschlichen Organismus werden kontinuierlich reaktive Sauerstoffspezies gebildet. Sie dienen zum einen der Abwehr von Bakterien (Phagozytose), andererseits fungieren sie auch als *second messenger* bei der Signaltransduktion einiger physiologischer Regulationsvorgänge und wirken bei inflammatorischen Prozessen chemotaktisch. Beim gesunden Menschen herrscht unter physiologischen Bedingungen eine Homöostase zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Inaktivierung. Da ständig reaktive Sauerstoffspezies z. B. in der Atmungskette produziert werden, entwickelte sich evolutionär ein fein justiertes System aus nicht-enzymatischen und enzymatischen antioxidativen Strukturen, das der Detoxifizierung dieser hochreaktiven Moleküle dient. Diese Aufgabe wird durch das antioxidative Schutzsystem übernommen. Gerät dieses Gleichgewicht aus der Balance, sei es durch einen vermehrten Anfall der ROS, die erschöpfte antioxidative Kapazität oder eine Kombination beider Umstände, z. B. bei Mangelernährung oder entzündlichen Prozessen, befindet sich der betroffene Organismus im „Oxidativen Stress“. Das antioxidative Schutzsystem umfasst eine Reihe von Enzymen: neben der NADPH – Oxidase, Katalasen u. a. auch Selenoproteine, die die hochreaktiven Sauerstoffradikale abbauen. Die antioxidative Kapazität ist durch den bei septischen Patienten festgestellten Selenmangel und die im Übermaß anfallenden ROS stark reduziert. Die Redoxsysteme, wie zum Beispiel die Glutathionperoxidase, aber auch andere Selenoproteine, sind erschöpft und unzureichend wirksam.

Wie wichtig letztlich die Ausschüttung von ROS nach Antigenkontakt („*respiratory burst*“) ist, wird unter anderem bei der Betrachtung der septischen Granulomatose deutlich. Hierbei handelt es sich um einen rezessiv, meist x-chromosomal vererbten Immundefekt aller phagozytären Zellen. Dabei werden

zwar die katalasepositiven Bakterien und Pilze in die phagozytierenden Zellen aufgenommen, durch den fehlenden oder verminderten „*respiratory burst*“ persistieren jedoch die Erreger intrazellulär. Histopathologisch lassen sich Granulome nachweisen. Klinisch leiden die Patienten an Infektionen der Haut, des lymphatischen Systems etc. Aus der chronischen Inflammation kann sich ein septisches Krankheitsbild entwickeln, das mit einer hohen Mortalität einhergeht. (Segal et al., 1985)

1.9. SELEN ALS ANTIOXIDANS

In den letzten Jahren wurde das Spurenelement Selen für die Biomedizin zunehmend interessanter und rückte in den Fokus verschiedener Therapieansätze von Fachdisziplinen wie der Onkologie, der Intensivmedizin u.a.. Als Co-Faktor zahlreicher Redoxregulatoren wie z.B. der Glutathionperoxidase oder der Thioredoxin-Reduktase wirkt Selen der Zellschädigung durch Radikalbildner oder Lipidhydroperoxide entgegen. Es moduliert u.a. die Lymphozytenfunktion, steigert die Aktivität von natürlichen Killerzellen und bestimmt u.a. die Funktionstüchtigkeit der Schilddrüsenhormone, die bei einem Mangel an Selen durch entsprechende Supplementation verbessert werden kann. (Gärtner et al., 2002) Belegt ist der Einfluss von Selen auch auf DNA-Reparaturmechanismen sowie auf die Initiation von Apoptose. Die antikarzinogene Wirkung von Selen ist auf antimutagene, antiproliferative, antiradiotoxische und antivirale Effekte, Metallentgiftung und das Abbinden von Karzinogenen wie Benzpyren oder Aflatoxin, aber auch auf Apoptoseinduktion zurückzuführen. Neuere molekularbiologische Untersuchungen deuten darüber hinaus auf eine spezifische Rolle von Selen bei der NF- κ B-vermittelten Expression von Genen hin, die in immunologische Vorgänge involviert sind. (Kretz-Remy et al., 2001) Selen kommt als Selenocystein, welche auch als 21. Aminosäure angesehen wird, im aktiven Zentrum verschiedener Enzyme, genauer den Selenoproteinen vor. Diese sind u.a. an der Erhaltung der Homöostase des Redox-Status beteiligt. Aktuell sind über 20 selenhaltige Enzyme mit unterschiedlichen physiologischen Wirkungen bekannt. Beispielhaft seien das Selenoprotein P

zum Schutz vor oxidativer Endothelschädigung, die Glutathionperoxidase sowie intrazelluläre Selenoenzyme zur Reduktion des oxidativen Stresses genannt. (Burk et al., 2003) In klinischen Studien wurde mehrfach ein erniedrigter Selen-Plasmaspiegel bei inflammatorischen Erkrankungen beschrieben. (Zimmermann et al., 1997; Forceville et al., 1998; Sakr et al., 2007) Mit zunehmender Schwere einer septischen Erkrankung wurde ein erniedrigter Plasma-Selenspiegel festgestellt. (Forceville et al., 1998). Die hohe Mortalität von Patienten mit einer systemischen Inflammationsreaktion sowie bei Sepsis konnte trotz umfangreicher Maßnahmen im Rahmen der Intensivmedizin nicht wesentlich reduziert werden. In kleineren klinischen Studien wurde der Selenmangel durch die Substitution von Selen in Form von Selenit ausgeglichen. (Zimmermann et al., 1997; Gärtner et al., 2001) Dabei konnte eine Reduktion der Mortalität um 15 – 20 % beobachtet werden. Mit der Supplementation von Selen bei kritisch Kranken mit nachgewiesenem Selenmangel konnte die antioxidative Kapazität, eben auch durch eine messbar gesteigerte Aktivität der Glutathionperoxidase, wieder verbessert werden. Neuere molekularbiologische Untersuchungen deuten auch auf eine spezifische Rolle von Selen bei der NF- κ B-vermittelten Expression von Genen hin. (Zhang u. Ghosh, 2001)

Somit liegt die Vermutung nahe, dass durch den Ausgleich eines Selenmangels durch Supplementation dieses Spurenelementes ein gutes therapeutisches Instrument vorliegen könnte. Da nur wenige Untersuchungen bei heterogener Datenlage zum genauen Wirkmechanismus von Selen bei Inflammationsreaktionen vorliegen, konnte bisher noch keine Empfehlung zur Substitution ausgesprochen werden.

Betrachtet man das ubiquitäre Vorkommen von selenhaltigen Enzymen im Organismus, könnte dies bei der Suche nach einer effektiven Therapiemöglichkeit ein möglicher durchgreifender Ansatz sein.

Die Gabe von Antikörpern gegen TNF- α wurde in bisherigen Therapieversuchen zunächst als potentiell Mittel, das die Entzündungskaskade vermeintlich modulieren könnte, angesehen. Dieser Ansatz konnte sich jedoch aufgrund seiner „eingeschränkten“ Wirkweise in der Therapie der generalisierten inflammatorischen Erkrankungen nicht durchsetzen. Eine vielversprechende und evidenzbasierte Therapie der

Schweren Sepsis sowie des septischen Schocks stellt die Gabe von aktiviertem Protein C (APC) dar. (PROWESS, Bernard et al., 2001) In dieser Studie konnte die Letalität von 30,8% in der Placebogruppe auf 24,7% in der mit APC therapierten Gruppe gesenkt werden. Jedoch bestand eine erhöhte Blutungsneigung. Das aktivierte Protein C bietet mit seinen antikoagulatorischen und antiinflammatorischen - über Inhibition der LPS-induzierten Zytokin-Freisetzung und Herunterregulation von CD11b und der damit verbundenen verminderten Adhäsivität - Eigenschaften einen effektiven Therapieansatz. Zudem wirkt es durch die Herunterregulation von p53 anti-apoptotisch.

2. ZIEL– UND AUFGABENSTELLUNG

Selen wirkt als Co-Faktor zahlreicher Redoxregulatoren, wie z. B. der Glutathionperoxidase, der Zellschädigung durch Radikalbildner oder Lipidhydroperoxide entgegen. Es moduliert die Lymphozytenfunktion und steigert u.a. die Aktivität natürlicher Killerzellen. Die Funktionstüchtigkeit beispielsweise von Schilddrüsenhormonen konnte durch die Supplementation bei einem Selenmangel verbessert werden. Belegt ist der Einfluss von Selen auch auf DNA-Reperaturmechanismen sowie die Initiation von Apoptose. Neuere molekularbiologische Untersuchungen deuten darüber hinaus auf eine spezifische Rolle von Selen bei der NF- κ B-vermittelten Expression von Genen hin, die in immunologische Vorgänge involviert sind. (Kretz-Remy et al., 2001) Der bei kritisch Kranken nachgewiesene erniedrigte Selen – Plasmaspiegel ist Zeichen eines Selenmangels und korreliert mit der Erschöpfung der antioxidativen Kapazität. Der „oxidative Stress“ beim systemischen Inflamationsreaktionssyndrom kann durch das antioxidative Schutzsystem nicht mehr bewältigt werden und unterhält die Immunreaktion des betroffenen Organismus im Sinne eines *circulus vitiosus*. In Studien mit kleineren Kohorten von Intensivpatienten mit schwerer Sepsis konnte durch die Substitution von Na-Selenit eine Reduktion der Letalität beobachtet werden. Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Mediatoren beeinflussen die Genexpression inflammationsrelevanter Gene. Durch Analysen wie sie mit Hilfe der Microarray-Technologie durchgeführt werden können, ist das Monitoring von Genexpressionsmustern möglich. Die aktuelle Datenlage ist jedoch bezüglich des modulierenden Einflusses von Na-Selenit auf die inflammationsrelevante Genexpression unklar.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die systematische Analyse differentieller Genexpression nach stimulatorischer Aktivierung und die Charakterisierung regulatorischer Effekte einer Selenit–Supplementierung mittels eines auf Microarray–Technologie beruhenden Testsystems zur Bewertung spezifischer inflammatorischer Einflussfaktoren in mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

Daher wurden folgende Hypothesen zu Bearbeitung in dieser Arbeit aufgestellt:

- *Die Expression von inflammationsrelevanten Genen in immunkompetenten Zellen wird nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren durch die Präinkubation mit Na-Selenit verändert.*
- *Mit Hilfe der Microarray-Technologie lassen sich relevante Selenit-abhängige Signaltransduktionsmechanismen für das Indikationsgebiet Sepsis identifizieren.*

Hieraus ergaben sich für die Bearbeitung folgende Aspekte:

- *Identifizierung und valide Bewertung neuer, bisher unbekannter biofunktional relevanter signaltransduktorischer Interaktionen nach stimulatorischer Aktivierung mit proinflammatorischen Mediatoren und antioxidativ wirksamen Inhibitoren im Kontext*
- *Parallele Darstellung einer Vielzahl relevanter Moleküle in einem einzigen Messvorgang*
- *Untersuchung möglicher kausaler Zusammenhänge zwischen inflammatorischen Faktoren auf molekularer und zellulärer Ebene*
- *Möglichkeit des Nachweises eines Genexpressionsmusters von immunkompetenten Zellen unter Seleneinfluss, das mit der in kleinen Kohorten klinisch beobachteten und beschriebenen Reduktion der Letalität korreliert*
- *Möglichkeit der Ableitung selen-abhängiger Regulationsmechanismen von der Analyse der Genexpression*

Zur Bearbeitung der Hypothese wurde ein Modell mit immunkompetenten Zellen, mononukleäre Zellen aus Peripherblut (PBMC) gesunder Spender, gewählt. PBMC stellen bei Inflamationsprozessen eine wesentliche Zellpopulation dar. Unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung an essentiellen Schritten der proinflammatorischen und stressinduzierten Signaltransduktion wurden Lipopolysaccharid (LPS, Serotyp B4) sowie Tumornekrose Faktor alpha (TNF- α) als Stimulanzen zur detaillierten Untersuchung auf das Genexpressionsmusters ausgewählt.

Zur Beantwortung der zweiten Frage wurde zur Detektion von möglichen Regulationsmechanismen der Transkription und Beschreibung derselben eine *in-silicio* Analyse der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen (TFBS).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. MATERIAL- UND GERÄTELISTE

Zellseparation und Isolation, Kultur

Hank's w/o $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Leucosep®	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Lymphoprep	Nycomed (Density:1,077 g/ml)
Zellkulturgefäße	Nunc A/S, Roskilde, DK
RMPI 1640-Medium	Gibco BRL, Life Technologies Ltd., Paisley, UK
Inkubator	Heraeus Inkubator, Hanau, D
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5403, Hamburg, D

Biochemikalien zur Stimulation

LPS von E. coli (B4)	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor α	R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D
Selenit	Selenase, Biosyn, Fellbach, D

RNA-Isolation/ Reverse Transkription/ Gelelektrophorese

DNA-Längenstandard	100 bp DNA-Ladder zwischen 100 bp und 1500 bp und zusätzlichem Fragment von 2072 bp, Invitrogen, Stammkonzentration 1 $\mu\text{g}/1\mu\text{L}$
Ethidiumbromid	2,7-Diamino-10-ethyl-9phenyl-phenanthridinium- Bromid, Sigma
Reverse Transkription System, Superscript	Promega Corporation, Madison, USA
Taq DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
PCR Nucleotide Mix	Promega Corporation, Madison, USA
Yeast tRNA	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Orange G	Acid Orange 10, Sigma, 1,3-Naphthalen Disulfonsäure,7-Hydroxy-8-(-phenylazo)-, Natriumsalz, Gruppe Monoazo-Farbstoff
Agarose 1000	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
MOPS-Puffer	3-Morpholino-1-Propansulfonsäure Puffer, 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat und 10 mM EDTA, eingestellt auf pH-Wert 7,0 mit NaOH

TAE Puffer	TRIS Acetat EDTA Puffer mit 200 mM Tris Base, 200 mM Essigsäure und 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure, eingestellt auf pH- Wert 7,5 mit TRIS Base oder Essigsäure
Solution D	Guanidinium isothiocyanate 500 g ddH ₂ O 586 mL 0.75M sodium citrate, pH 7.0 35.2 mL 10% Sarkosyl 52.8 mL β-mercaptoethanol (add just prior to use) 40 uL per 5 mL of Solution D

Geräteliste

SpeedVac	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5402/5403,	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5412D	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vakuumkonzentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
DNA – Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ-Research, Watertown, USA
NanoDrop ND-1000	
Spectrophotometer	PeqLab, Erlangen
Elektrophoresekammern	EasyCast, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen,
Spannungsquelle	Power Pac 3000, BIO-RAD, Hercules, USA

Gelvisualisierung und –dokumentation

SYBER Green I	Molekular Probes INC., Eugene, USA
Herolab Easy Win 32	Gel-dokumentations-, Densitometrie- und Analysesystem, Herolab GmbH, Software: Herolab Easy Win 32

Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, Hybridisierung

RT- Kit	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
Cy 3, Cy 5	
ARES™Alexa Fluor® 647	Molecular Probes, Inc., USA
ARES™Alexa Fluor® 555	Molecular Probes, Inc., USA
Hybridisierungskammer	Tecan HS Hybridisierungsstation GenePix™

Microarray

Labarraytor 500–2

SIRSLab GmbH Jena

Datenbanken

Literaturrecherche

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (pub med)

Primerdesign

<http://www.ensembl.org/index.html>,
<http://www.ensembl.org>

3.2. ZELLISOLATION / ZELLPRÄPARATION

Für die Experimente wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) gesunder Spender des Instituts für Transfusionsmedizin isoliert. Hierfür wurden jeweils 500 ml Citratblut (Blutkonserve, Institut für Transfusionsmedizin) 1+1 mit HANKS-Puffer verdünnt.

Die mononukleären Zellen des Peripherblutes wurden mittels Leukosept-Röhrchen (Fa. GREINER) mit Lymphoprep[®] Separating Solution mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die anschließende Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfen der *Bürker*-Zählkammer. Zur Einstellung der gewünschten Zellkonzentration vom 10×10^6 Zellen pro Milliliter wurde die Zellsuspension in RPMI 1640 – Medium, das mit 1%igem humanen AB-Serum supplementiert wurde, aufgenommen. Die isolierten Zellen equilibrierten in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) bei einem CO₂ - Gehalt der Luft von 5% und bei einer Temperatur von 37 °C über 24 Stunden (HERAEUS Inkub ator, Hanau).

3.3. ZELLKULTUR UND STIMULATION

Die Behandlung der Zellen erfolgte bei 6 unterschiedlichen Konditionen. Während der Equilibrierung, wurde sofern dies indiziert war, den jeweiligen Proben Selenase[®] zugesetzt, so dass diese Proben über 16 Stunden mit Selenit präinkubierten. Wie im Folgenden aufgeführt, wurden anschließend, die Stimulantien LPS(B4) und TNF- α hinzu pipettiert. Die Einwirkungszeit der proinflammatorischen Mediatoren betrug jeweils 4 Stunden.

1. Selenase[®]

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640/1% human AB-Serum + 2 μ M Selenit (Selenase[®])

2. Selenase[®] (2 μ M, 16h Präinkubation) + Tumor Nekrose-Faktor α

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640/1% human AB-Serum + 2 μ M Selenit (Selenase[®], Präinkubation 16 h, anschließend + Tumor Nekrose Faktor α (5 ng/ml)

3. Selenase[®] (2 μ M, 16 h Präinkubation) + Lipopolysaccharide E. coli B4

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640/1% human AB-Serum + 2 μ M Selenit (Selenase[®], Präinkubation 16 h, anschließend + Lipopolysaccharide B4 100 ng/ml)

4. Tumor Nekrose-Faktor α (Fa. Sigma, Deisenhofen)

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640/1% human AB-Serum + Tumor Nekrose Faktor α (5 ng/ml)

5. Lipopolysaccharide E. coli B4 (Fa. Sigma, Deisenhofen)

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640/1% human AB-Serum + Lipopolysaccharide B4 100 ng/ml

6. – 10. Unbehandelte Kontrollen (basal)

100 Mio PBMC in 10.0 ml RPMI 1640 /1% human AB-Serum
(dieser Ansatz wurde jeweils für jedes Stimulationskriterium einzeln ausgeführt)

Daraus ergab sich folgendes Probenschema (siehe Abbildung 1).

	PBMC		Stimulus	Stimulation	Präinkubation		Arrays
1	unbehandelte Kontrolle	vs.	Selenase	4 h	16 h	1 Zellansatz, 2 Arrays mit getauschter Markierung	2
2	unbehandelte Kontrolle	vs.	Selenase + LPS	4 h	16 h	1 Zellansatz, 2 Arrays mit getauschter Markierung	2
3	unbehandelte Kontrolle	vs.	Selenase + TNF-α	4 h	16 h	1 Zellansatz, 2 Arrays mit getauschter Markierung	2
4	unbehandelte Kontrolle	vs.	LPS	4 h	./.	1 Zellansatz, 2 Arrays mit getauschter Markierung	2
5	unbehandelte Kontrolle	vs.	TNF-α	4 h	./.	1 Zellansatz, 2 Arrays mit getauschter Markierung	2

Abb. 1: Arbeitsplan zur Untersuchung des Genexpressionsprofils stimulierter humaner mononukleärer Zellen. Serumdefiziente, equilibrierte PBMC wurden 16 Stunden mit Selenase präinkubiert (Ansätze 1- 3) und anschließend über vier Stunden mit 100 ng/ml LPS (B4) Ansatz 2 sowie vier Stunden mit TNF- α (5ng/ml), Ansatz 3, stimuliert. Ansatz 1, der nach 16 Stunden Präinkubation ohne nochmalige Stimulation als Vergleichskontrolle dient, wurde ohne weiteren Zusatz über vier Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Die Ansätze 4 und 5 werden lediglich über vier Stunden mit LPS (B4) bzw. TNF- α stimuliert und fungieren als interne Kontrolle zur Abbildung des Genexpressionsmusters ohne Selenbehandlung. Nach der Stimulation werden die Zellen der RNA-Isolierung zugeführt, Nach Qualitätskontrolle der isolierten RNA, cDNA-Synthese und Markierung erfolgt die Bestimmung des Genexpressionsmusters. Als Bezug werden die zusammengeführten Ansätze der unbehandelten Kontroll-RNA-Präparationen eingesetzt, um die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu gewährleisten. Die Versuche werden mittels SIRS-Lab ARRAY (Lab-Arraytor 500 -2) durchgeführt.

3.4. RNA – AUFARBEITUNG

Die Total-RNA wurde mittels modifizierter saurer Guanidinium-Thiocyanate-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomzynsky und Sacchi et al. isoliert. (Chomzynsky et al, 1987)

Nach vierstündiger Inkubation konnten die Zellen durch Zentrifugation (4°C, 400 x g, 4 min) geerntet werden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen, wobei die Proben zur Reduzierung von eventueller Ribonukleaseaktivität auf Eis gekühlt wurden. Durch Zugabe von 1000 μ l Solution D erfolgte die Resolubilisierung und Lyse der Zellen. Die Suspension wurde über Nacht bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden den Proben 400 μ l 95% Ethanol hinzugefügt und für 10 Minuten auf dem Eis belassen. Danach wurden die Proben über 30 Minuten bei 15 000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert, um dann den Überstand absaugen zu können. Dieser wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde erneut mit 600 μ l Solution D resuspendiert. Anschließend wurden 60 μ l 2 M Natriumacetat (pH 4,0) hinzugefügt und gut durchmischt. Zur weiteren

Präparation wurden dem Gemisch 600 µl Phenol und 130 µl Chloroform zugesetzt, das Ganze wurde sorgfältig gemischt und für 15 Minuten auf Eis belassen. Dann erfolgte die Zentrifugation über 12 Minuten bei 15 000 Umdrehungen pro Minute (23 000 x G) und 4°C. Dabei entstanden drei Phasen in der Lösung (wässrige Phase, Interphase, organische Phase). (Wallace, 1987) Die wässrige obere, RNA-haltige Phase wurde sehr vorsichtig abgenommen und in ein neues 2-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt, der Rest (Interphase und organische Phase) wurde verworfen. Der abgesaugten RNA-haltigen Phase wurde dann im nächsten Schritt 700 µl eiskaltes Isopropanol zugesetzt und gut gemischt. Zur Präzipitation wurde das Gemisch für mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proben über 30 Minuten bei 15 000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene RNA-Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes mit 700 µl 75% gekühltem Ethanol gereinigt und zentrifugiert (12 Minuten, 15 000 Umdrehungen pro Minute, 4°C). Anschließend erfolgte das Absaugen und Verwerfen des Überstandes. Das Pellet wurde bei 72°C getrocknet und danach in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Zur Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurde eine Verdünnung von 1:4 mit RNase-freiem Wasser hergestellt.

3.4.1. QUALITÄTSKONTROLLE MITTELS ELEKTROPHORESE & SPEKTROPHOTOMETRIE

Ein Mikroliter des RNA-Eluats wurde zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit Hilfe des NanoDrop-Messgeräts (Software: NanoDrop 3.1.2.) verwendet. Sämtliche Proben wiesen entsprechende Quotienten zur Abschätzung des Reinheitsgrades der RNA auf ($A_{260/280} > 1.8$, $A_{230/260} > 2.0$). Die Qualität und die RNA-Integrität wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Zur Analyse der Integrität der RNA wurde jeweils ein Mikroliter der Probe mit Ladepuffer versetzt, über 15 Minuten bei 72 ° Celsius denaturiert und im 1%igen Agarose-Gel in Gegenwart von Formaldehyd aufgetrennt. Die Elektrophoresebedingungen waren: 5V/cm über eine Laufzeit von ca. 2 Stunden. Die Detektion erfolgte mittels CCD-Kamera mit E.A.S.Y-Win Software. In sämtlichen Proben konnte das charakteristische Bandenmuster (18S, 28 S

ribosomale RNA, keine niedermolekularen Hydrolyseprodukte) nachgewiesen werden. Die Ansätze wurden insgesamt dreimal durchgeführt, erhaltene RNA zur Minimierung individueller Schwankungen zusammengeführt. Die folgenden zwei Abbildungen, Nr. 2 und 3 zeigen beispielhaft die Messungen.

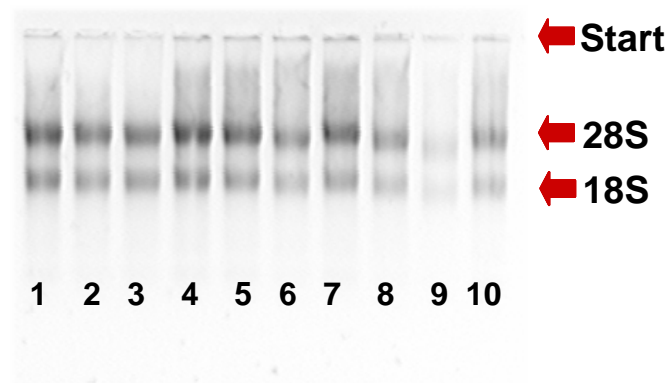


Abb. 2 Beispielhafte Gelelektrophorese der 10 verwendeten Proben (1 Selenase, 2 Selenase + TNF α , 3 Selenase + LPS, 4 TNF α , 5 LPS, 6 – 10 unstimulierte Kontrolle)
Sämtliche Proben wiesen ein charakteristisches Bandenmuster (18S, 28 S ribosomale RNA, keine niedermolekularen Hydrolyseprodukte) auf.

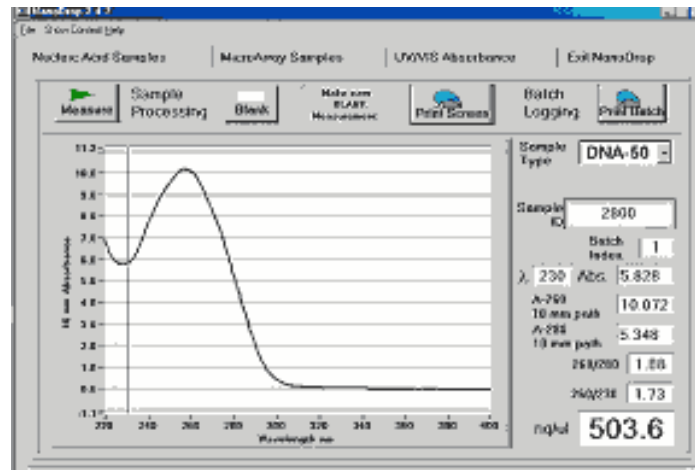


Abb.3 Die Kurve zeigt den typischen Verlauf einer RNA-Messung mittels NanoDrop, unter Verwendung des geräteinternen Programms für die Messung der Extinktion bei 260 und 280 nm sowie die hieraus erfolgte Berechnung des Extinktionsquotienten 260/280. Dabei gilt RNA mit einem Quotienten > 1,7 als sehr rein und proteinfrei bei einem Quotienten von 1,8 – 2,0. Der Extinktionsquotient der in dieser Arbeit verwendeten Proben lag zwischen 1,6 und 2,0.

3. 5. MICROARRAY-EXPERIMENT

Zur Analyse des Expressionsprofils in den PBMC ist in der vorliegenden Arbeit die Mikroarray-Technik angewendet worden, mit deren Hilfe ein Vergleich der Expression in unbehandelten Kontrollzellen und den stimulierten Zellen erfolgte. Zur Sicherung der Daten wurden die Experimente einmal mit getauschten Fluoreszenzfarbstoffen Cy 3 und Cy5 („swapped arrays“) wiederholt durchgeführt.

Bei dem eingesetzten Microchip *Labarraytor human 500–2* handelt es sich um einen indikationsbezogenen Biochip mit 485 humanen inflammationsrelevanten Genen, der zur Klärung spezieller Fragestellungen bei akuter Inflammation und Sepsis dient. So können im Rahmen von Genexpressionsuntersuchungen wesentliche zelluläre Mechanismen entzündlicher Krankheiten aufgeklärt werden. Die aufgetragenen Gene sind in verschiedene Gruppen untergliedert wie z. B.:

- Oberflächenproteine und Rezeptoren,
- Signaltransduktion, Zell-Zyklus und Apoptose,
- Transkriptionsfaktoren und Modulatoren,
- Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren.

Zum Vorgehen: Zur reversen Transkription werden insgesamt 36 µg Total-RNA eingesetzt. Das untenstehende Schema zeigt die eingesetzten Mengen für die vorliegenden Untersuchungen. Zur weiteren internen Qualitätskontrolle und Normalisierung wurden sogenannte *spikes* eingesetzt. Die folgende Zusammenstellung veranschaulicht die eingesetzten Mengen zur Hybridisierung:

a) sample-mixture Cy-3

spike 1(1:10)	0.5 µl
spike 2(1:100)	0.5 µl
Oligo-d(T)	2.0 µl
sample RNA	36 µg
Aqua	ad 18.0 µl

b) sample mixture Cy-5

spike 1(1:10)	0.5 µl
spike 2(1:100)	0.5 µl
Oligo-d(T)	2.0 µl
sample RNA	36 µg
Aqua	ad 18.0 µl

c) spike mixture 3-5 (Cy-3)

spike 3(1:10)	1.0 µl
spike 4(1:50)	1.0 µl
spike 5(1:10)	1.0 µl
Oligo-d(T)	1.0 µl
Aqua	14.0 µl

d) spike mixture 3-5 (Cy-5)

spike 3(1:10)	1.0 µl
spike 4(1:10)	1.0 µl
spike 5(1:50)	1.0 µl
Oligo-d(T)	1.0 µl
Aqua	14.0 µl

e) spike 6 (Hybridization control)

spike 6 (1:10)	2.0 µl
Oligo-d(T)	1.0 µl
Aqua	15.0 µl

Der Anlagerungsprozess erfolgte durch die Erwärmung auf 70 °C für 10 min und die anschließende unmittelbare Lagerung auf Eis für mindestens 10 min. In der Zwischenzeit wurde der Reverse-Transkriptions-Mix nach folgendem Schema (Angaben pro Probe) hergestellt:

5X RT-Reaktionspuffer	6.0 µl	6.0 µl
50XdNTP*	0.6 µl	0.6 µl
DTT100 mM	3.0 µl	3.0 µl
RNasin	0.4 µl	0.4 µl
Superscript RT 200 U/µl	2.0 µl	0.5 µl
Aqua ad 12 µl	./.	1,5 µl

*50XdNTP: dATP 100 mM, dGTP 100 mM, dCTP 100 mM, dTTP 20 mM
Aminoallyl-dUTP 80 mM

Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C und einer Dauer von 120 min, nachdem jeweils 12 µl vom entsprechenden Reverse-Transkriptions-Mix dazu pipettiert wurden.

Im Anschluss erfolgte die Hydrolyse durch die Zugabe 250 mM NaOH sowie von 125 mM EDTA (pH 8.0). Die Proben wurden 15 Minuten auf 65 °C erhitzt. Danach ist den Proben 625 mM TRIS-HCl, pH 7.4, zur Neutralisierung beigegeben worden. Die Inhalte der bisher verwendeten Eppendorf-Gefäße wurden nun mittels Microcon Y-30 (Mikrogefäß) und dreimaliger Zentrifugation (10 Minuten bei 12.000 x g und Raumtemperatur) konzentriert. Die erhaltene

cDNA wurde im Vakuumtrockner bei 45°C bis zur vollständigen Trocknung entwässert und schließlich bei 4°C gelagert.

3.5.1. PCR-VERIFIZIERUNG

Die cDNA wurden in 36 µl Wasser resolubilisiert. 200 ng der cDNA, d.h. 0.6 µl der erhaltenen Lösung wurden mit 8.4 µl Wasser nochmals verdünnt und davon 3.0 µl für PCR Ansatz in einer Hot-Start PCR mit spezifischen Primern für das housekeeping-gene GAPDH amplifiziert. (23 Zyklen, Annealingtemperatur 60 °C). Das erhaltene Produkt entsprach der erwarteten Größe.

Die in Aqua resolubilisierte cDNA wurde erneut mit Hilfe des Vakuumtrockners konzentriert. Unterdessen wurden zu den Spike – Proben (Spike 3, 4, 5) jeweils 9 µl Hydrogencarbonat-Puffer (0.1 M, pH 9.0), zum Spike 6 18 µl zugegeben um zu resolubilisieren. Die Spike – Proben (Spike 3-5/Cy3; Spike 3-5/ Cy5) wurden anschließend in die Röhrchen mit den jeweiligen cDNA – Proben überführt, um diese ebenfalls zu resolubilisieren und gründlich vermischt. Nach 60 Minuten wurden die Inhalte in die Proben der entsprechenden Eppendorf – Röhrchen mit den vorbereiteten Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3, Cy5) überführt. Die Spike 6 – Proben wurden zu je 9 µl auf 1µl Farbstoff gegeben. Das Arbeiten erfolgte im lichtgeschützten Bereich. Der Markierungsprozess (Labelling) wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt, wobei nach je 15 Minuten die Proben sorgfältig durch Pipettieren gemischt wurden. Anschließend erfolgte das Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 4,5 µl Hydroxylaminehydrochlorid (4 M) zu jeder Reaktion. Nachdem die Proben über 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubierten, wurden sie nach folgendem Schema gereinigt: Zu den Proben-cDNA wurden je 70 µl und zu den beiden Spike 6 (Cy3, Cy5) je 85 µl TE-Puffer hinzugefügt, zusätzlich 500 µl PB-Puffer aus dem QIAquick PCR purification kit. Alle Proben wurden nach gutem Mischen in Filtersäulen überführt und für 1 min. bei 14.000 x G zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden auf den Filtermatrix mit den Proben je 750 µl PE-Puffer dazugegeben, um eine weitere Aufreinigung der Proben zu erreichen. Danach erfolgte die erneute Zentrifugation (1 min., 14.000 x G). Zum Auffangen der zu

analysierenden Probe wurden die Säulen in neue Sammelgefäße überführt und zweimal mit je 30 µl EB-Puffer befüllt und nach 1 Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur für wiederum eine Minute bei 14.000 x G zentrifugiert.

Von der erhaltenen 60 µl Eluationslösung wurde 1 µl zur Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop abgenommen.

Den Proben wurden nun 20 µl cot1 humane DNA hinzugefügt und durch Zugabe von 420 µl TE – Puffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt, den Spike 6 – Proben wurden 440 µl TE – Puffer zugesetzt. Dieses Volumen wurde in je ein neues Microcon (Mikrogefäß) überführt und für 10 Minuten bei 12.000 x G zentrifugiert. Danach wurde der Microcon-Filter umgekehrt in ein neues Sammelgefäß gegeben, um nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 16.000 x G die Proben zu erhalten. Dieser Vorgang wurde nach Zugabe von 10 µl TE – Puffer auf die Probensäulen und eine Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur wiederholt. Im Anschluss erfolgte mit Hilfe der SpeedVac die Konzentrierung der gekennzeichneten Proben - cDNA auf ein Volumen von 10 µl, die Spike 6 auf je 3 µl.

Zur Vorbereitung der Hybridisierungsphase wurden zwei Wasserbäder vorbereitet, eines wurde für die Denaturierung auf 99°C erwärmt. Für die Hybridisierung selbst ist eine Wasserbadtemperatur von 65°C notwendig. Folgender Mix wurde zusammengestellt: 2 µl poly(A)-RNA 10µg/µl, 2 µl yeast tRNA 10 µg/µl, 4,35 µl 20 X SSC, hinzu kamen jetzt die gelabelten Spike 6 - Proben (3µl Cy3, 3µl Cy5) sowie die gelabelte Proben - cDNA (9,90 µl). Abschließend wurden noch 0,75 µl SDS 10% hinzugefügt. Danach erfolgten der Verschluss des Gefäßes und die Denaturierung im Wasserbad für zwei Minuten. Zwischenzeitlich wurde die Hybridisierungskammer vorbereitet, die Schablone des Arrays LabArraytor 500 - 2 zur Positionierung der Proben hineingelegt und 10 µl Wasser an jeder Seite eingefüllt. Das Eppendorf-Gefäß wurde abzentrifugiert und die Probe auf die vorbereiteten Objektträger zügig aufgebracht. Schließlich wurde ein Deckgläschen platziert, die Kammer verschlossen und vorsichtig für 20 Stunden ins Wasserbad gelegt. Am nächsten Tag wurden fünf Gefäße mit vier verschiedenen konzentrierten Waschlösungen vorbereitet (siehe Tabelle 1).

Tab. 1 Verwendetes Schema zum Waschen des Objektträger

Wasch-puffer	Zusammensetzung	Volumen [ml]	SSC	10 % SDS	Zeit [min]
1	SSC 2 x + 0,03 %SDS	400	400 ml SSC 2 x	1,2 ml	
1	SSC 2 x	400	400 ml SSC 2 x	1,2 ml	2
2	SSC 2 x	400	400 ml SSC 2 x		
3	SSC 1 x	400	400 ml SSC 1 x		2
4	SSC 0,2x	400	400 ml SSC 0,2x		2

Die Hybridisierungskammer wurde aus dem Wasserbad genommen und sorgfältig getrocknet und geöffnet, anschließend wurde der Objektträger sofort in der ersten Lösung geschwenkt, um das Deckgläschen zu entfernen. Für zwei Minuten wurde dann das Glas bei 600 Umdrehungen pro Minute des Rührstabes in Waschpuffer 1 gespült. Es folgte das Schwenken in Waschpuffer 2 um die Reste vom SDS zu entfernen. Jetzt schlossen sich noch für jeweils zwei Minuten Waschvorgänge in den Waschpufferlösungen 3 und 4 an, um letztlich durch zweiminütige Zentrifugation bei 500 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur eine Trocknung zu erreichen.

3.5.2. AUSWERTUNG UND NORMALISIERUNG

Das Scannen der Microarrays erfolgte mit Hilfe der Virtek Chipreaders bei 550 nm (Cy3) und 650 nm (Cy5), zur Erfassung und Berechnung der Daten diente die „AIDA Software Imaging“. (AIDA Array Metrix, AIDA Arry Compare, Raytest GmbH, Straubenhardt). Die Software bietet eine automatische Spotidentifikation, Hintergrundsubtraktion und Normalisierung, automatische Elimination minderwertiger Spots und Datenfiltration.

Bei der Datenerfassung und –auswertung wurden die Richtlinien und Empfehlungen des sog. MIAME- Dokuments der aktuellen Fassung beachtet. (Brazma et al., 2001)

3.5.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS Statistikpaket (Versionen 8.0-11.0) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels deskriptiver statistischer Verfahren ausgewertet. Zur Anwendung kam hier der Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind als mediane Expressionswerte der untersuchten Proben dargestellt, alle anderen Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Ein P-Wert $<0,05$ wurde als signifikant erachtet. In allen Experimenten wurden nur solche Gene als differentiell exprimiert akzeptiert, wenn das mediane Expressionsniveau zwischen den untersuchten Gruppen einen mehr als $\geq 2,5$ -fachen Unterschied zeigte und gleichzeitig der P-Wert $<0,05$ war. Des Weiteren musste der Unterschied in der medianen Expression mindestens 0,1 betragen, um möglichst nur Gene zu erhalten, die sich mittels gen-spezifischer PCR validieren ließen.

3.6. REVERSE TRANSKRIPTION (RT)

Die qualitätskontrollierte RNA wurde für 10 Minuten bei 70°C erwärmt und abzentrifugiert und schließlich zum Abkühlen auf Eis gelagert. Zur RT wurden jeweils 2 µg Total-RNA mit 1 µl oligo-dT- Primer und 1µl dNTP-Mix in einem Gesamtvolumen von 12 µl -Aqua wurde hinzupipettiert- eingesetzt. Dieses Gemisch wurde zur Denaturierung und zur Primeranlagerung 5 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend 5 Minuten auf Eis gelagert. Vom in der Zwischenzeit zubereiteten Mix aus 4 µl 5xPuffer, 2 µl 0,1 M DTT (Invitrogen), 1 µl RNAsin (Promega) und 1 µl RT-Superscript (Invitrogen) wurden anschließend 8 µl hinzugefügt. So ergab sich ein Endvolumen von 20 µl mit der eingesetzten Total-RNA Konzentration von 0,1 µg/µl. Die "first-strand"-cDNA wurde bei 42°C für 50 Minuten synthetisiert. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten und anschließender rascher Kühlung auf 4°C wurde die Reverse Transkription beendet. Abschließend erfolgte eine 1:1 Verdünnung mit 20 µl 1xB- Puffer. Die Lagerung der RT-Produkte erfolgte bei -20°C.

3.7. POLYMERASE–KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase–Kettenreaktion wurde mit 4 µl der first–strand–DNA in 20 µl Hot–Start–PCR durchgeführt. Es wurde zunächst ein Master-Mix aus folgenden Bestandteilen hergestellt: 1,6 µl MgCl₂,
1,5 µl 10xPuffer,
0,4 µl dNTP–Mix und
4,5 µl Aqua.

Diese 8 µl Mastermix wurden in 8er PCR–Gefäße vorgelegt, dazu kamen 3 µl vom jeweiligen Primermix und die 4 µl der Proben – cDNA. Zum Schluss wurde dem Ganzen noch 5 µl Taq–Polymerase–Mix zugeben, dieser setzte sich wie folgt zusammen: 4,4µl Aqua,
0,5 µl 10x Puffer,
0,1 µl Taq Polymerase. (Promega Corporation)

Die für die Detektion der mRNA notwendigen Primer wurden im Folgenden tabellarisch (siehe Tab. 2) erfasst.

Die PCR-Amplifikation wurde mit dem Peltier Thermocycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt. Der vierminütigen Denaturierung bei 94°C folgte ein erstes *primer annealing* bei 60°C für 1 Minute, danach folgten in Abhängigkeit der zugegebenen Primer mehrere Zyklen bei 72°C für 1 Minute, bei 94°C für 1 Minute und bei 60°C für 1 Minute. Abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Tab. 2: Verwendete Primersequenzen mit Angabe der PCR-Produktlänge und der angewandten Zyklenzahl

Gene	Primer	Produkt [bp]	Zyklen
PTGS2	5'- TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT- 3' (fwd.)	320	23
	5'- AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT- 3'(rv.)		
IL-6	5'- ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC - 3' (fwd.)	628	27
	5'- GAA GAG CCC TCA GGC TGG ACT G - 3' (rv.)		
LAMR1	5'- GAG CTC CCT TGT TGT TGC AT - 3' (fwd.)	544	22
	5'- GAG CTC CCT TGT TGT TGC AT - 3' (rv.)		
GADPH	5'- ATG ACC CCT TCA TTG ACC TCA - 3' (fwd.)	907	19
	5'- TTA CTC CTT GGA GGC CAT GTG - 3' (rv.)		
CD 74	5'- GAG GCG GTC TTC AAC ATC C - 3' (fwd.)	556	22
	5'- GCC CTG AAA GCT GAT AAC AAG -3' (rv.)		
IL-8	5'- ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT - 3' (fwd.)	292	25
	5'- GAG AAG TTT TTG AAG AGG GCT GAG A - 3'(rv.)		
MAP3K14	5'- CCC AGC TTA GCC TCT TCT C - 3' (fwd.)	246	30
	5'- GCA GTA CCA AGG CTG CAG TT - 3' (rv.)		
IL-4	5'- CGG CAA CTT TGT CCA CGG A - 3' (fwd.)	111	36
	5'- TCT GTT ACG GTC AAC TCG GTG - 3'(rv.)		
TNFα	5'- ATG AGC ACT GAA AGC ATG ATC C - 3' (fwd.)	217	36
	5'- GAG GGC TGA TTA GAG AGA GGT C - 3' (rv.)		
NFκB	5'- CTA TGA CCT GGA TGA CTC TTG - 3' (fwd.)	973	27
	5'- GGA CAA CAG CAA TGA CAA CAG - 3'(rv.)		
CCL3	5'- CGT GTG ACC TCC ACA GCT AC- 3'(fwd.)	233	32
	5'- TGC CTA CAC AGG CTG ATG AC- 3'(rv.)		
TLR9	5'- GTG CCC CAC TTC TCC ATG - 3'(fwd.)	260	32
	5'- GGC ACA GTC ATG ATG TTG TTG 3'(rv.)		
S100A12	5'- TCA TAT CCC TGG TAG CCA TTG - 3'(fwd.)	130	32
	5'- AAG GCT GGG TTT TGG TGA G - 3'(rv.)		

3.7.1. ELEKTROPHORESE

Um die PCR-Fragmente zu separieren, wurden 6 µl von jedem Amplifikationsprodukt zusammen mit 2 µl Orange G auf 1,5 %ige Agarosegele, die mit SYBR Green I versehen worden waren, aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung fand bei einer konstanten Spannung von 60 Volt über einen Zeitraum von 210 Minuten statt. Zur Spannungserzeugung diente eine Power Pac 3000 Spannungsquelle. Als Laufpuffer diente gekühlter TAE – Puffer, pH 7,5.

3.7.2. AUSWERTUNG

Die Dokumentation und Auswertung der Gele erfolgte unmittelbar nach den Elektrophoresen mit Hilfe des E.A.S.Y.-RH-Bilddokumentations- und Analysesystems (Herolab GmbH, Wiesloch)

3.8. PROMOTERANALYSE

Jedes Gen weist Bindungsstellen für Regulatorproteine auf. Diese kontrollieren, wann und in welchen Zellen das Gen exprimiert wird. Diese Kontrollstrukturen sind im so genannten Promoter des Gens lokalisiert. Promoteranalysen helfen bei der Klärung der Frage, durch welche Regulatorproteine ein bestimmtes Gen in einem bestimmten Zellverband zur Expression gebracht wird. Diese Methode ist sehr bedeutend für die Klärung hierarchischer Strukturen in Regelnetzwerken.

Die Promoteranalyse wurde unter dem Aspekt durchgeführt um mögliche Regulationsmechanismen durch Selen auf Transkriptionsebene vorherzusagen. Auf Basis der Mikroarray-Daten wurden mit Hilfe des MatInspectors (Genomatix, München) *in-silicio* potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (TF) auf einer vorgegebenen DNA-Sequenz durchsucht. Dazu greift das Programm auf eine Datenbank zurück und überprüft kurze Bindemotive bekannter TF, die als „core“ – Matrix (Kernsequenz-Ähnlichkeit) bezeichnet werden, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit sie in der zu untersuchenden DNA-Sequenz auftreten. (Quandt et al., 1995, Klingenhoff et al., 1999) Die Ergebnisse werden prozentual als Kernsequenzähnlichkeit angegeben. Die Analyse der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren wurde im Bereich der ersten 525 Basen vom 5'-UTR-Endes durchgeführt, dabei wurden charakteristische Bindungsstellen für relevante Transkriptionsfaktoren analysiert und sowohl die Lokalisation als auch die absolute Häufigkeit ermittelt und statistisch ausgewertet.

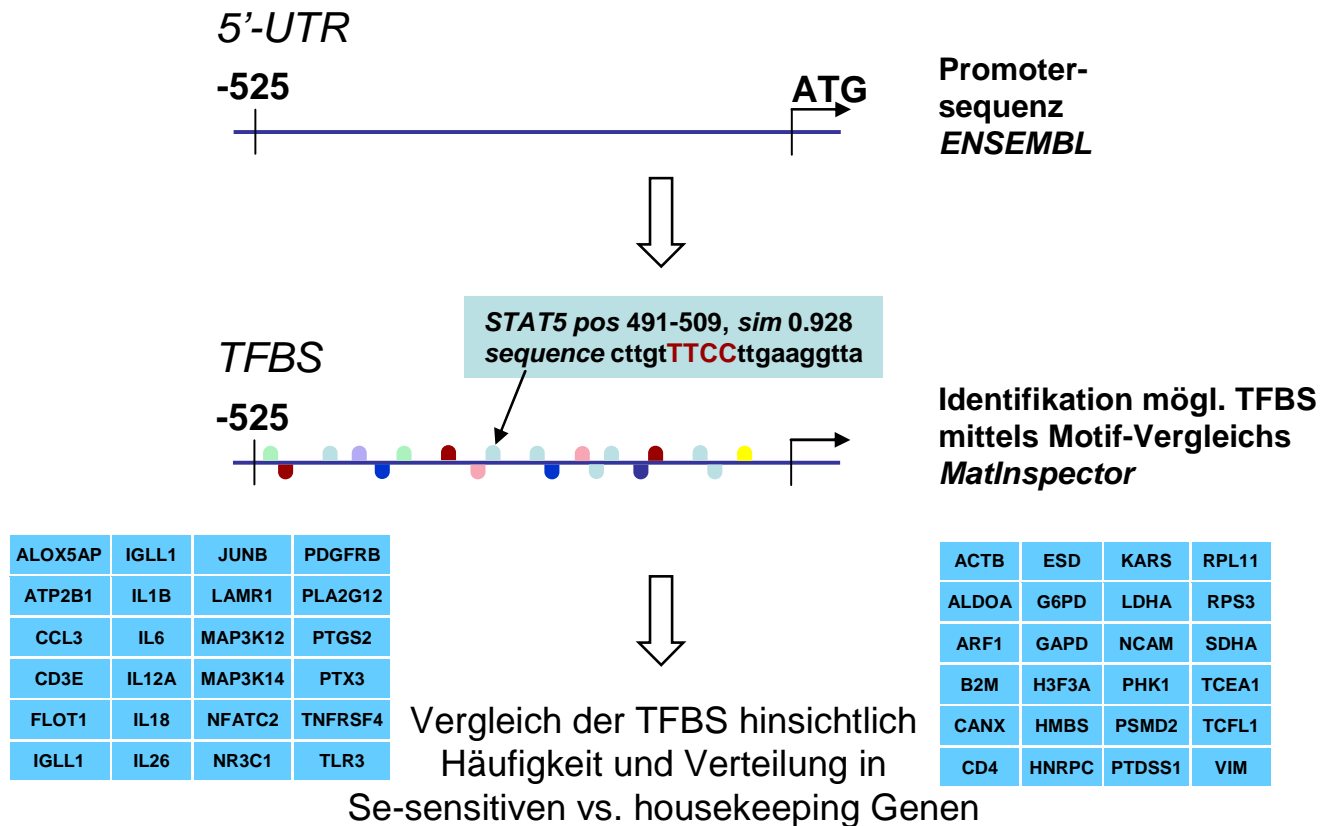


Abb. 4: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation von TFBS und deren statistischen Vergleich. Von 24 Se-sensitiven (links) und 24 unveränderten housekeeping Genen (rechts) wurde die Promotersequenz in der *ENSEMBL*-Datenbank eingelesen und die 5'-UTR bis zur Position -525 ausgehend vom Transkriptionsstart ATG mittels der Software *MatInspector* auf potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren analysiert. Beispielhaft ist eine Bindestelle für *Signal transduces and activator of transcription 5* **STAT5** mit den Parametern Position (pos), Ähnlichkeit der vermuteten Bindungssequenz (sim, hier 92,8 %) und die spezifische Bindungssequenz (hier **TTCC**) angegeben. Die in beiden Gruppen identifizierten TFBS wurden mittels Wilcoxon-Test auf unterschiedliche Verteilung getestet. Im Anhang (3) ist beispielhaft die Ergebnisübersicht zur TFBS-Analyse des Gens S100A12 aufgeführt.

4. ERGEBNISSE

Ingesamt wurden drei Ansätze mit isolierten humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes betrachtet. Die Versuche umfassten sechs verschiedene Bedingungen: Nach der Equilibrierung der Zellen und 16-stündiger Präinkubation mit Selenit in drei Ansätzen, wurden in zwei dieser Ansätze die Stimulanzen LPS und TNF- α hinzupipettiert. In zwei weiteren Petrischalen erfolgte lediglich die Zugabe von diesen proinflammatorischen Mediatoren zur Stimulation, ebenfalls für vier Stunden. Ein weiterer Kontrollansatz wurde ohne jegliche Beifügung unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Isolation der RNA aus den stimulierten Proben sowie den Kontrollen wurde diese im Array-Experiment weiterverarbeitet. Die Proben der umgeschriebenen cDNA wurden mit fluoreszierenden Markern (Cy3 und Cy5) gekennzeichnet und der Hybridisierung unter standardisierten Bedingungen zugeführt. Dabei wurde jeweils die cDNA der unstimulierten Kontrolle mit einer stimulierten Probe auf einen Microarray aufgetragen und mittels AIDA-Analyse Software verglichen und ausgewertet. Zur Kontrolle wurden die Experimente zur Genexpression mit getauschter Markierung wiederholt, so dass für die statistische Auswertung insgesamt pro Probenpaar sechs Datensätze herangezogen werden konnten. Auf dem verwendeten Microchip 500–2 waren jeweils drei Genfelder („Arrays“) mit den 485 zu untersuchenden Genen inklusive der „housekeeping“-Gene aufgetragen.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse beider Verfahren.

Um genauere Erkenntnisse zu möglichen Regulationsmechanismen der Genexpression zu gewinnen und diese zu verstehen, vor allem die Veränderungen unter Zugabe von Selen wurde eine vergleichende Analyse der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren an der DNA mit Hilfe des MatInspector durchgeführt. Die dabei gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer semiquantitativen PCR verifiziert. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse.

4.1. AUSWERTUNG DES MICROARRAY- EXPERIMENTS

Die Expressionsdaten der inflammationsrelevanten Gene, die sich auf dem Microchip 500–2 befinden, sind mit Hilfe der Software AIDA (AIDA Array Metrix sowie AIDA Array Compare, Raytest GmbH, Straubenhardt) ausgewertet worden.

Die Rohdaten wurden normalisiert und eine Tabelle mit den Expressionsdaten erstellt. Eine ausführliche Genliste befindet sich im Anhang.

Tab. 3 Genliste (Auszug) inflammationsrelevanter Gene, Genexpressionsraten von stimulierten PBMC mit TNF- α (10ng/ml) bzw. LPS (200ng/ml) mit/ohne Na-Selenit (μ – Mittelwerte, σ - Standardabweichung der Expressionsraten).

HUGO	GenBank ID	TNF		(+Se TNF		LPS		(+Se LPS	
		μ	σ	μ	σ	μ	σ	μ	σ
ATF4	XM_039372	4,42	3,44	2,09	1,53	1,45	0,44	1,13	0,18
CCL3	XM_008450	6,68	2,42	1,53	0,52	7,56	5,84	15,66	2,12
CD74	XM_003937	2,25	0,54	0,55	0,22	2,30	1,51	1,27	0,31
ICAM1	XM_049516	4,74	1,32	1,19	0,51	1,16	0,73	1,54	0,93
IL1B	XM_010760	3,19	1,42	1,39	0,28	1,16	0,46	0,51	0,18
IL4	NM_0005892	2,78	2,05	2,79	3,62	0,69	0,69	1,63	2,34
IL6	XM_057491	2,79	0,68	1,62	0,41	1,20	0,47	2,94	0,91
IL7	NM_000880	1,15	0,31	1,24	0,26	1,13	0,47	0,81	0,18
IL8	NM_000584	11,46	9,14	0,34	0,22	0,52	0,69	0,86	0,61
JUNB	XM_009064	1,54	0,08	0,76	0,56	1,45	0,46	2,11	0,60
LAMR1	NM_002295	1,36	0,10	0,97	0,08	1,23	0,42	1,27	0,22
MAP3K14	XM_008346	2,11	0,83	1,47	1,78	0,53	0,48	0,56	0,12
MIF	NM_002415	1,64	0,46	0,85	0,41	0,88	0,65	1,35	0,09
NFKB1	AF_213884	4,38	0,48	1,16	0,45	1,57	0,53	3,91	1,26
PTGS2	NM_000963	4,34	1,66	1,69	1,25	1,51	1,02	2,70	0,98
SMPD1	NM_000543	1,09	0,28	1,54	1,56	0,41	0,14	0,77	0,19
TGFB1	XM_030906	3,14	1,17	1,93	0,30	0,68	0,35	1,18	0,16
TLR4	NM_138556	1,85	0,75	1,09	0,78	1,98	1,48	1,02	0,30
TLR9	BC_032713	1,84	0,36	1,37	1,18	0,88	1,01	0,40	0,17
TNF	XM_041847	4,30	1,81	1,26	0,59	0,93	0,52	3,07	1,67
TREM1	NM_018643	1,68	0,98	1,71	1,78	0,95	0,11	1,29	0,70

Die Liste umfasst die auf dem Chip aufgetragenen inflammationsrelevanten Gene und die gewonnenen Daten in Abhängigkeit von den in dieser Arbeit untersuchten, proinflammatorischen Mediatoren LPS, TNF- α ohne bzw. nach Zugabe von Natrium-Selenit.

In der oben aufgeführten Liste wurden die besonders interessanten Gene aus den Gruppen der Zytokine und Interleukine sowie Mediatoren zusammengestellt, z. B. die Gene für TLR 4, und 9, TREM1 als Untereinheit von Toll-like-Rezeptoren. Im Weiteren wurden Gene von Oberflächenmolekülen, wie z.B. ICAM als ein Gen für interzelluläre Adhäsionsmoleküle bei der

endothelialen Dysfunktion eine Rolle spielend, und Gene für die Signaltransduktion (NF- κ B, TNF- α) sowie die Zell-Zell-Vermittlung erfasst.

Nach der Betrachtung und dem Sortieren der Expressionsdaten lassen sich neun verschiedene Gruppen darstellen.

Es wurden Veränderungen der Genexpression bei einer relativen Zunahme der Expression um den Faktor 1,5 bzw. bei einer relativen Abnahme um den Faktor 0.66 berücksichtigt.

Tab.4 Zusammenstellung der Gengruppen
(herunterreguliert: ↓; hochreguliert: ↑; unverändert: ↔)

Gengruppe	Anzahl der Gene	Anteil an untersuchten Genen
TNF↓, LPS ↔	265	54,6%
TNF↓, LPS↑	87	17,9%
TNF↔, LPS↔	51	10,5%
TNF↓, LPS↓	47	9,7%
TNF↑, LPS↔	21	4,3%
TNF↔, LPS↑	5	1,0%
TNF↑, LPS↑	4	0,8%
TNF↑, LPS↓	3	0,6%
TNF↔, LPS↓	2	0,4%

Dabei konnten 265 Gene als eine Gruppe identifiziert werden. Dies entspricht einem Prozentanteil von ca. 55%, der in Gegenwart von TNF- α und Selenit eine verminderte Expression zeigte. Die Expressionsraten der mit LPS stimulierten Proben ließen dabei keine Veränderungen erkennen. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise die Gene ALOX5AP, CD24, CREB3, HMGB1, FOSB, IL1B, JUNB, MAP2K3, TGFB1, TLR9. In zwei weiteren Gruppen von je 87 Genen (ca. 18%) bzw. 47 Genen (ca. 10%) konnte ebenfalls eine Herunterregulierung in Gegenwart von Selenit und TNF- α ermittelt werden. Die Veränderungen der Expressionsraten in Anwesenheit von LPS und Selenit wiesen in diesen Gruppen jedoch in unterschiedliche Richtungen auf. Einerseits wurden die Gene durch LPS heraufreguliert (ca. 18%), andererseits wurde in der anderen Gruppe bei 47 Genen (9,7%) eine *Down*-Regulation durch beide Stimulantien registriert.

Bei ca. 10 % der Gene wurden keine Änderungen der Expressionsrate durch die Präinkubation mit Na-Selenit und nach der Stimulation mit den präinflammatorischen Mediatoren LPS und TNF- α nachgewiesen.

Die folgende Abbildung stellt die o.g. Zuordnung der Gengruppen graphisch dar.

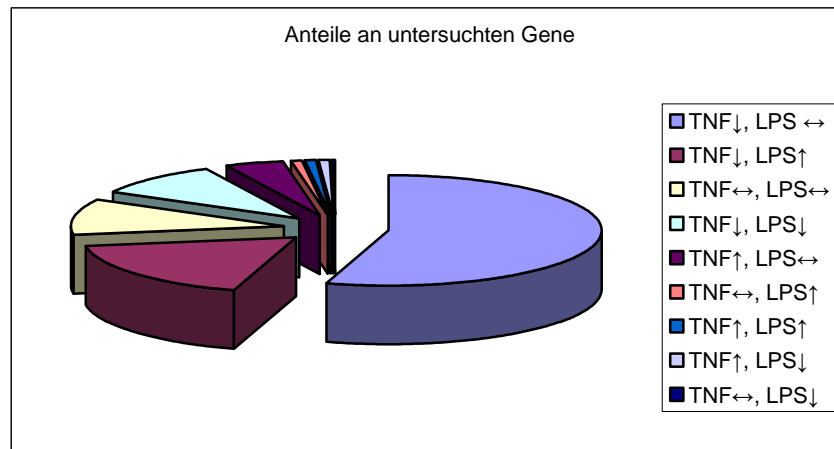


Abb.5 Darstellung der Anteile differentiell veränderter Gene nach Stimulation mit LPS und TNF- α in Gegenwart von Selen

4.1.1. UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSIONSRATE

Im Weiteren erfolgte die statistische Auswertung der Unterschiede in der Expressionsrate an 12 ausgewählten Genen. Diese zeigten in der Genexpressionsanalyse besonders große Differenzen beim Vergleich der mit lediglich proinflammatorischen Mediatoren stimulierten und mit Selenit vorbehandelten Proben. Zur Anwendung kam hier der Wilcoxon-Test. Die 12 selektierten Gene (ALOX5AP, CCL3, ATP2B1, CD3E, FLOT1, ICAM1, IL1B, IL6, JUNB, LAMR1, MAP3K14, PTGS2) offenbarten in der Gegenüberstellung der mit LPS (B4) stimulierten Zellen signifikant veränderte Werte und bei den Zellen, die mit TNF- α behandelt wurden, ergaben sich hochsignifikante Werte. Die folgende Abbildung veranschaulicht diesen Zusammenhang:

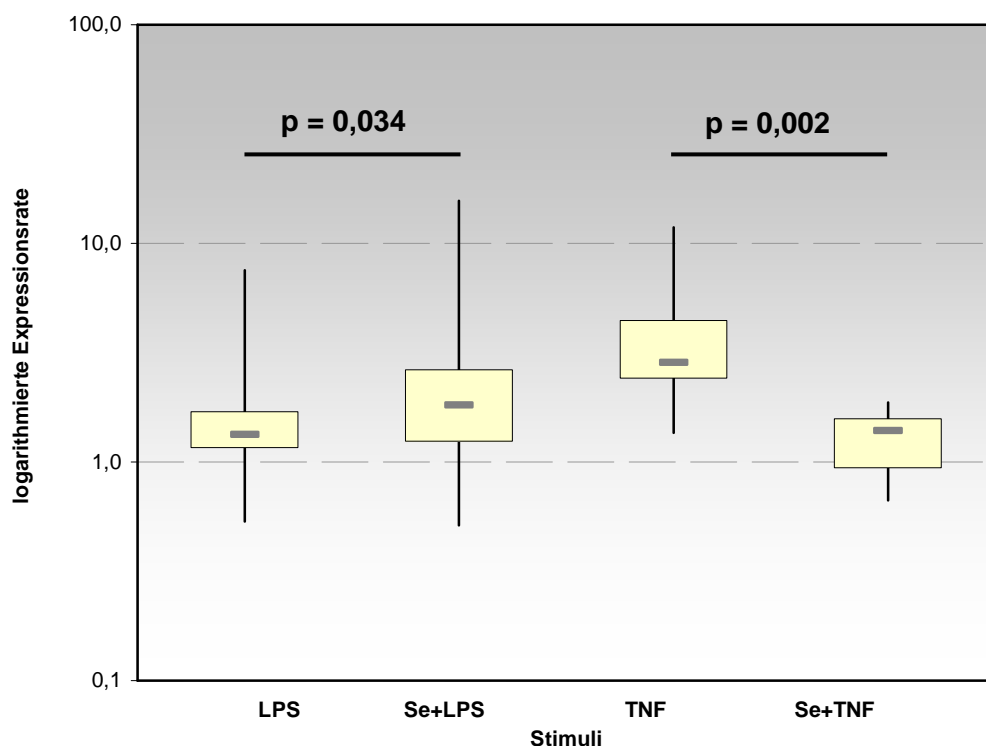


Abb. 6 Variation der Genexpressionsraten aus 12 ausgewählten Genen (ALOX5AP, CCL3, ATP2B1, CD3E, FLOT1, ICAM1, IL1B, IL6, JUNB, LAMR1, MAP3K14, PTGS2) in Abhängigkeit vom Stimulus. Die Expressionsraten wurden hier zusammengefasst betrachtet.

Dabei zeigte sich im Vergleich zu der mit TNF- α behandelten Gruppe ein signifikanter Unterschied ($p=0,002$). In den Gruppen, die mit LPS stimuliert wurden trat dieser auffällige Unterschied ($p=0,034$) nicht auf.

Stimulus	Median	Oberes Quantil	Maximum	Minimum	Unteres Quantil
LPS	1,34	1,70	7,56	0,53	1,16
Se+LPS	1,83	2,64	15,66	0,51	1,24
TNF	2,86	4,44	11,85	1,36	2,41
Se+TNF	1,39	1,58	1,88	0,67	0,94

Tab. 5 Interquartilabstände der in Abb. 6 dargestellten Werte.

Betrachtet wurden auch die zwölf Gene im Einzelnen. Dabei stellten sich die Unterschiede der Expression wie folgt dar (angegeben sind immer die Mittelwerte der Expressionsraten): ALOX5AP wurde in Gegenwart von TNF- α auf das 2,92 fache hochreguliert, unter dem Einfluss von Selen zeigte sich eine Expressionsrate von 0,99. In ähnlicher Größenordnung lagen die Werte der Gene ATP2B1 (2,54 vs. 0,83), FLOT1 (2,52 vs. 0,67), IL-1B (3,19 vs. 1,39) und IL-6 (2,79 vs. 1,62). Sehr markant war der Unterschied der Expressionsraten bei den untersuchten Genen CCL3 und CD3E; hier wurden eine Herunterregulierung vom 6,68fachen auf das 1,53fache unter dem Einfluss von Selenit bzw. vom 11,85fachen auf das 1,88fache der Expression beobachtet. ICAM veränderte sich vom 4,74fachen auf das 1,19fache, JUNB zeigte eine Veränderung vom 1,54fachen auf das 0,76fache, MAP3K14 vom 2,11fachen auf das 1,47fache der Expression. Bei PTGS2 konnte eine Downregulation vom 4,43fachen auf das 1,69fache unter Seleneinfluss nachgewiesen werden. Die Abbildung 7 stellt dieses Ergebnis mit Bezug auf die einzelnen Gene grafisch dar.

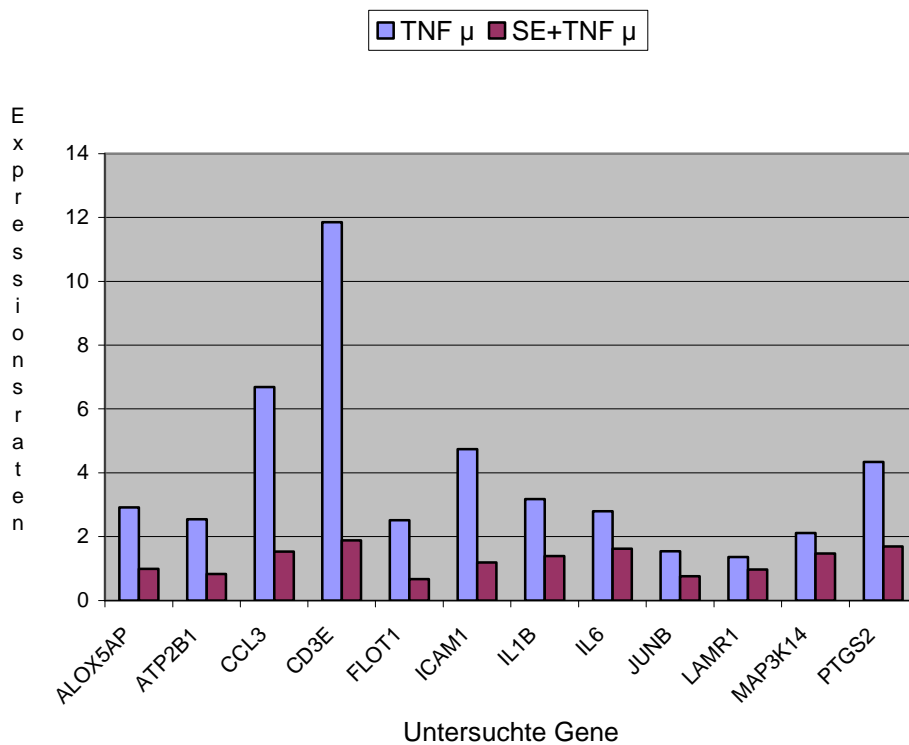


Abb. 7 Vergleich der Mittelwerte (μ) der Expressionsraten unter dem Einfluss von TNF- α mit/ohne Selen

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem proinflammatorischen Mediator LPS stellten sich bei den gleichen Genen wie folgt dar: 4 Gene blieben auch nach der Präinkubation mit Selenit in ihrer Expression unverändert. Dazu zählen ALOX5AP (0,66 vs. 1,33), IL-1B (1,16 vs. 0,51), LAMR1 (1,23 vs. 1,27) sowie MAP3K14 (0,53 vs. 0,56). ATP2B1 wurde durch LPS auf das 1,67fache heraufreguliert, in Gegenwart von Selen war hier ein Anstieg der Expressionsrate auf das 2,22fache zu verzeichnen, ähnliche Werte und Richtung (*Up-regulation*) konnten bei CD3E (1,78 vs. 2,62), ICAM1 (1,16 vs. 1,54), IL-6 (1,20 vs. 2,94), JUNB (1,45 vs. 2,11), PTGS2 (1,51 vs. 2,70) herausgearbeitet werden. Besonders groß war der Unterschied beim CCL3: durch LPS wurde eine 7,56fache Genaktivierung erreicht, in Gegenwart von Selenit hingegen eine Expressionsrate von 15,66 registriert. Eine Herunterregulierung unter Selenit zeigte das Gen FLOT1 (2,22 vs. 1,18). Diese Werte spiegeln sich in Abbildung 8 wider.

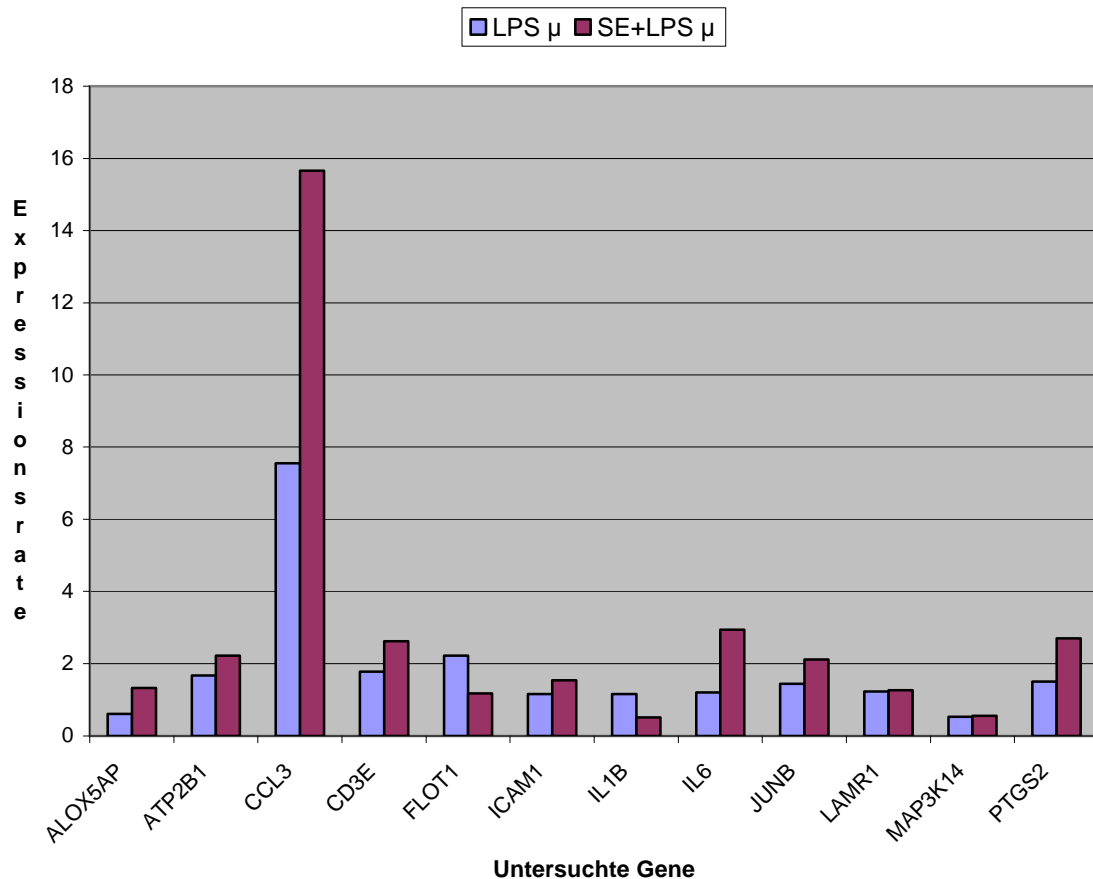


Abb. 8 Vergleich der Mittelwerte (μ) der Expressionsraten unter dem Einfluss von LPS mit/ohne Selen

4.1.2. VALIDIERUNG DER GENEXPRESSIONSDATEN ZUM MICROARRAY-EXPERIMENT MITTELS SEMIQUANTITATIVEN RT-PCR

Zur Verifizierung der ermittelten Daten aus der Mikroarray-Analyse wurden die Proben der am stärksten veränderten, aber auch der interessantesten Gene und Primer mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Dabei korrelierten die PCR-Daten der differentiell exprimierten Gene mit den Daten der Microarray - Analyse.

In der folgenden Abbildung (Abb. 9) sind die Gelelektrophoresen der Amplifikationsprodukte des „Housekeeping“-Gene GAPDH, sowie von CD 74, IL-8, IL-4, TNF α , MAP3K14, NF- κ B, CCL3 und TLR9 dargestellt. Dabei zeigen die ersten drei Reihen, jeweils mit (+) markiert, die Veränderung der Genexpression nach der Präinkubation mit Na-Selenit, wovon die zweite und

dritte vertikale Reihe die Expression nach entsprechender Zugabe der proinflammatorischen Mediatoren LPS (1) und TNF- α (2) abbilden. In Reihe vier und fünf ist die Expression nach alleiniger Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren LPS (1) und TNF- α (2) zu sehen. Die Expression der Kontrollgruppe wurde in der sechsten vertikalen Reihe dargestellt.

Die Amplifikationsprodukte der Proben spiegeln dieselben Veränderungen der Transkription wie im Mikroarray-Experiment wider. Die Banden des „housekeeping“-Gens GAPDH zeigten unter allen Bedingungen, wie sie bereits im Kapitel 3.3. beschrieben wurden, keine Veränderungen der Expression. Die Banden der Amplifikationsprodukte von CD74, IL-8, IL-4 sowie TNF- α und NF- κ B stellen sich unter dem Einfluss von LPS bzw. TNF- α stärker dar. Die Banden der Amplifikationsprodukte der Proben, die mit Selenit vorbehandelt wurden, waren schwächer ausgeprägt. Bei den Amplifikationsprodukten der Gene MAP3K14 und TLR9 sind in der Expression nur sehr geringe Unterschiede zu konstatieren. Die Banden des Gens CCL3 bilden in den in Kombination (Selenit und Stimulanzen) behandelten Proben eine stärkere Expression ab.

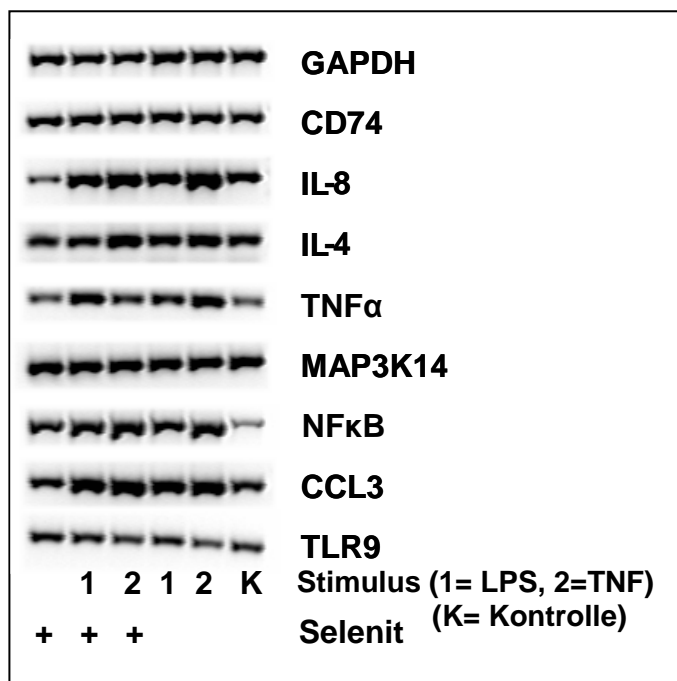


Abb. 9 Zusammenstellung der Gelelektrophoresen der Amplifikationsprodukte aus der sq-RT-PCR der Gene CD 74, IL-8, IL-4, TNF- α , MAP3K14, NF κ B, CCL3 und TLR9.

4.2. PROMOTERANALYSE MITTELS MATINSPECTOR

Um herauszufinden, ob Gene in ihrem 5'-flankierenden Regionen Selen-sensitive *cis*-regulatorische Elemente enthalten, wurden zunächst vergleichende *in silicio*-Analysen von Promotoren durchgeführt. Bei dieser Suche wurden zunächst die verfügbaren Daten zur Funktionalität der verschiedenen Promoterelemente nicht berücksichtigt. Die *in silicio*-Promoteranalyse wurde mit der Genomatrix-Software *MatInspector* (München) durchgeführt.

Bei der Regulation der Transkription spielen Transkriptionsfaktoren eine wesentliche Rolle. Diese Proteine können entweder direkt an die DNA binden, indirekt über andere DNA-bindende Proteine oder einen Promoter aktivieren bzw. inhibieren. Sie sind u.a. für einige Aktivierungs- und Differenzierungsvorgänge in Zellen notwendig. Die Transkriptionsfaktor-DNA-Bindungsstellen (TFBS) stellen spezifische Muster kurzer Basensequenzen dar. Die Analyse der Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren erfolgte im Bereich der 525 Basen vom 5'-UTR- Endes. Dabei wurden bis zu 30 charakteristische Bindungsstellen für relevante Transkriptionsfaktoren analysiert und sowohl deren Lokalisation als auch deren absolute Häufigkeit ermittelt. Als repräsentatives Ergebnis sind die TFBS im Promoterbereich des S100A12-Gens im Anhang (3) aufgeführt. In die Betrachtung wurden die „*housekeeping*“-Gene einbezogen, so dann Gene, die deutliche Veränderungen in der Expression durch Selengabe aufwiesen sowie Gene, die durch die Präinkubation keine veränderte Expression zeigten.

Daraus ließen sich drei Gruppen von Genen ermitteln. Die Verteilung der TFBS in den drei Gruppen ergab ein spezifisches Muster, das sich folgendermaßen zusammensetzt:

Gengruppe	Absolute Anzahl der TFBS	Unterschiede der TFBS
unveränderte <i>housekeeping</i> – Gene	1640	269
Selen-sensitive Gene	1659	267
Selen-insensitive Gene	1616	259

Tab. 6 Es wurde jeweils die Gesamtanzahl der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen (TFBS) ermittelt und der jeweiligen Gengruppe zugeordnet, zudem wurden die sich unterscheidenden TFBS herausgearbeitet und ebenfalls der jeweiligen Gruppe zugeordnet.

Tab. 7 Ergebnisse der Promoteranalyse – zusammenfassende Darstellung

Analysierte Transkriptionsfaktorenbindungsstelle	Housekeeping-Gene		Sensensitive Gene		Sig.
	Absolute Anzahl der TFBS	Anzahl der Gene	Absolute Anzahl der TFBS	Anzahl der Gene	
Activator protein 4	10	5	6	5	
Alpha (1)-fetoprotein TF (FTF), (LHR-1)	3	3	-	-	*
AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	7	6	3	3	
cAMP-response element binding protein	-	-	3	3	*
cAMP-responsive element binding protein 1	6	3	3	3	
CCAAT/enhancer binding protein	3	3	-	-	*
CCAAT/enhancer binding protein beta	3	2	8	7	*
Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site	12	6	7	5	
CP2	7	4	-	-	*
Drosophila hairy/enhancer of split homol.-1 (HES-1)	8	4	2	2	*
Elk-1	11	8	8	4	
Epstein-Barr virus transcription factor R	9	7	4	4	*
GAGA-Box	-	-	25	4	*
GLI-Krueppel-related TF, regulator of AV E4 promoter	7	4	2	2	
Heat shock factor 1	5	3	5	3	
Hepatic leukemia factor	2	2	7	5	
Hepatic nuclear factor 1	8	4	7	5	
Hepatic nuclear factor 4	-	-	7	6	*
Hypoxia induced factor-1 (HIF-1)	5	2	-	-	*
Hypoxia inducible factor, bHLH / PAS protein family	3	3	-	-	*
Interferon-stimulated response element	-	-	1	1	
LBP-1c, CP2, SEF (SAA3 enhancer factor)	7	7	2	2	*
Mammalian C-type LTR TATA box	-	-	5	3	*
MIT (microphthalmia transcription factor) and TFE3	-	-	4	4	*
Muscle Initiator Sequence	8	5	1	1	*
Myelin TF1-like, neuronal C2HC zinc finger factor 1	2	2	9	5	*
Myogenic MADS factor MEF-2	3	2	-	-	*
Myogenin / nuclear factor 1 or related factors	12	9	-	-	*
NF-kappaB	6	3	10	6	
Octamer-binding factor 1	5	3	17	8	*
Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	1	1	9	5	*
Pax1 paired domain protein (mouse)	8	8	2	2	*
PAX6 paired domain and homeodomain	5	4	-	-	*
Ras-responsive element binding protein 1	9	5	4	3	
Ribonucleoprotein ass. zinc finger MOK-2 (human)	11	9	3	2	*
Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	4	3	3	3	
Stimulating protein 1 SP1, ubiquitous zinc finger TF	12	4	4	3	
Thing1/E47 heterodimer, TH1 bHLH member	-	-	4	3	*
Transcrip. repressor of genes for lipid metabolism	7	3	2	2	
v-Myb, variant of AMV v-myb	9	6	1	1	*
X-box-binding protein 1	3	2	-	-	
Xenopus fork head domain factor 2 (Foxl1a)	3	3	-	-	*
Zinc finger / POZ domain transcription factor	20	7	4	4	*
Zinc finger RP58 (ZNF238), ass. with heterochromatin	-	-	3	3	*

Tab. 7 Zusammenstellung der analysierten TFBS, in ihrer absoluten Zahl. Bei 28 Transkriptionsfaktoren konnte ein signifikanter Unterschied in der Verteilung und der Anzahl herausgearbeitet werden. (Rot - „Housekeeping-Gene“, Orange - Selen-sensitive Gene, Grün - Selen-insensitive Gene) Werte mit $p < 0.05$ wurden als signifikant bewertet, angewandt wurde der Wilcoxonstest.

Die Tabelle zeigt die Verteilung der Transkriptionsfaktorenbindungsstellen. So werden Gene, bei deren Regulation beispielsweise der Transkriptionsfaktor (TF) CP-2 eine Rolle spielt, den „*housekeeping*“-Genen zugeordnet - in der Tabelle rot unterlegt. Dem TF „*Hepatic nuclear factor 4*“ kommt bei den Selen-sensitiven Genen (orange markiert) eine entscheidende Rolle bei der Regulation zu. Die Gruppe der Selen-insensitiven Gene werden z. B. durch den TF „*Octamer binding factor 1*“ gekennzeichnet. Sowohl im Vergleich der Gruppen 1 und 2, als auch der Gruppen 2 und 3 wurden hier TFBS ermittelt, die signifikante Werte ergaben.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon - Test, in dem die Gruppen eins und zwei („*housekeeping*“-Gene vs. selen-sensitive Gene) sowie die Gruppen zwei und drei (selensensitive Gene vs. Selen-insensitive Gene) verglichen wurden. Dabei ergaben sich als signifikant erachtete Werte von $p < 0.05$.

4.2.1. BESTÄTIGENDE SEMIQUANTITATIVE RT-PCR ZUR PROMOTERANALYSE

Zur Kontrolle des gewählten Modells erfolgte durch eine semiquantitative RT-PCR mit ausgewählten Genen (SF3B3 und ALOX5AP, SMPD1 und GAPDH). Dabei zeigte sich bei den selen-sensitiven inflammationsrelevanten Genen (SF3B3 und ALOX5AP) jeweils eine abgeschwächte Bande in den mit Selenit behandelten Proben im Vergleich zu den Proben, die nur mit den proinflammatorischen Mediatoren behandelt wurden. Bei dem vermuteten selen-insensitiven Gen SMPD1 und „*housekeeping*“-Gen GAPDH ergaben keine Veränderungen nach der Inkubation mit Selenit, alle Banden stellten sich nahezu gleich stark dar, womit die Ausgangshypothese bestätigt wurde.



Abb.10 Zusammenstellung der RT-PCR Produkte zur Bestätigung der Promoteranalyse. Analyse der Transkripte aus stimulierten PBMC (TNF- α 10 ng/ml, LPS B4 200ng/ml). SF3B3 und ALOX5AP wurden dabei als selen-sensitiv, SMPD1 und GAPDH als selen-insensitiv bestätigt.

Die Amplifikationsprodukte der untersuchten Gene spiegelten dieselben Veränderungen wider. Dabei zeigen die ersten drei senkrechten Reihen, jeweils mit (+) markiert, die Veränderung der Genexpression nach der Präinkubation mit Na-Selenit, wovon die zweite und dritte vertikale Reihe die Expression nach entsprechender Zugabe der proinflammatorischen Mediatoren LPS (1) und TNF- α (2) abbilden. In Reihe vier und fünf wird die Expression nach alleiniger Stimulation mit den proinflammatorischen Mediatoren LPS (1) und TNF- α (2) veranschaulicht. Die Expression der Kontrollgruppe wurde in der sechsten senkrechten Reihe dargestellt.

Unter Verwendung der Software *MatInspector* wurden mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den 5'-flankierenden Regionen der Gene S100A12 (vgl. Anhang 3) und SF3B3 gefunden.

Bei dieser Suche handelte es sich um ein rein strukturelles Verfahren, bei dem keinerlei funktionelle Aspekte berücksichtigt wurden, deshalb können auch keine Schlussfolgerungen hinsichtlich der Funktionalität der identifizierten cis-regulatorischen Sequenzen abgeleitet werden. Entsprechende Experimente bleiben weiterführenden Arbeiten vorbehalten.

5. DISKUSSION

In mehreren klinischen Studien wurde ein signifikant erniedrigter Plasma-Selenspiegel in Zusammenhang mit dem Schweregrad einer systemischen Inflammationsreaktion beschrieben. Dieser wurde dabei in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock nach dem entsprechenden APACHE II Score eingeteilt. (Forceville et al., 1998; Sakr et al., 2007) Dabei korrelierte der Plasmaspiegel von Selen invers mit der Schwere septischer Erkrankungen und positiv mit deren *Outcome*. Es wurde ein Selen - Plasmaspiegel von ca. 40 % vom Normalen bei septischen Patienten nachgewiesen, dieser ist assoziiert mit einem größeren Gewebeschaden, Infektionen sowie Organversagen, zudem bestand eine 3-fach höhere Mortalität.

Im Rahmen der Abwehr einer systemischen Inflammation spielt zur Beseitigung der vermehrt anfallenden „freien Radikale“ das antioxidative System des Organismus eine wesentliche Rolle. Einen wichtigen Baustein in diesem System stellt das Spurenelement Selen dar. Selen kommt als Selenocystein im aktiven Zentrum von ca. 25 bisher bekannten Selenoproteinen vor, die u. a. an der Abpufferung der reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind. In einigen kleineren Studien zu unterstützenden Therapieoptionen im Rahmen der Behandlung von Patienten mit septischen Krankheitsbildern konnte gezeigt werden, dass durch die Substitution von Selen die Mortalität von diesen Patienten signifikant gesenkt wurde. (Gärtner et al., 1997; Zimmermann et al., 1997) Ein wesentlicher Kritikpunkt ist jedoch, dass es sich hierbei um zu kleine Kohorten und damit um eine eingeschränkte Aussagekraft handelte, so dass keine Evidenz für die klinische Anwendung besteht und zum momentanen Zeitpunkt keine Empfehlung zur Substitution von Selen ausgesprochen werden kann. Auch Metaanalysen, z.B. von Heyland und Kollegen, belegen, dass die Substitution von Spurenelementen und Vitaminen die antioxidativen Schutzfunktionen unterstützt. Insbesondere die parenterale, hoch dosierte Gabe von Selen, allein oder in Kombination mit anderen Antioxidantien, sei sicher und mit einer Reduzierung der Mortalität von kritisch Kranken verbunden, jedoch war kein Vorteil bei den Komplikationen durch Infektionen ersichtlich. (Heyland et al., 2005)

Bemerkenswert ist, dass in den Studien, die einen Trend zur Reduktion der Mortalität zeigten, eine höhere Selen-Dosis (500–1000 µg/Tag) als die Mediandosis (500µg/d) zur Anwendung kam. Niedrigere Dosen hatten keine Auswirkung auf die Mortalität. (Geoghegan et al., 2006)

Für die adäquate Funktion des antioxidativen Schutzsystems ist eine ausreichende Menge an Vitaminen, Spurenelementen, u.a. von Selen, notwendig. Messungen, z.B. der Aktivität der Glutathionperoxidase, ergaben, dass es durch die Substitution von Selenit zu einer Zunahme der Selenoproteine kam und damit die Toleranz gegenüber freien Sauerstoffradikalen und die Funktion des antioxidativen Schutzsystems verbessert werden konnte. (Börner et al., 1997)

In einigen Studien wurde ein modulierender Einfluss von Selen z.B. auf molekularer Ebene beschrieben. So arbeiteten z.B. Jozsef et al. einen modulierenden Einfluss von Selen auf Transkriptionsfaktoren heraus. (Jozsef, 2003) Eine andere Untersuchung von Blessing et al. zeigte den direkten Effekt von Selen auf die Genexpression und DNA-Reparaturmechanismen durch die direkte Wechselwirkung von Selen u.a. mit der Familie der Zink-Finger-Proteine. Zudem wurde eine Veränderung der Bindungsaktivität dieser Proteinfamilie, der myc-Proteine und den assoziierten Faktoren, ATF und CREB-Proteinen, sowie ihrer korrespondierenden Bindungsproteine als Inhibitoren der DNS-Synthese-Proteine beschrieben. (Blessing et al., 2004)

Untersuchungen, wie das Spurenelement Selen speziell bei Entzündungsprozessen auf die Genexpression in immunkompetenten Zellen wirkt, konnten in der Literatur nicht eruiert werden.

Für die Fragestellung dieser Arbeit wurde ein Modell mit isolierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) entwickelt. Diese Zellen spielen u.a. in der Ätiologie einer Sepsis und eines Multiorganversagens eine entscheidende Rolle. Diese Methode wurde gewählt, um Erkenntnisse der differentiellen Genexpression in immunkompetenten Zellen des menschlichen Organismus nach Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren in Abhängigkeit von Selenit zunächst im Modell und unter kontrollierten Bedingungen zu gewinnen.

In der Arbeit von Fradin et al. ist ein anderes interessantes Modell beschrieben worden. Hier diente ein Vollblutansatz zur Beschreibung der Veränderungen

der Genexpression. Durch die Inkubation mit *Candida albicans* konnten vorwiegend in den mononukleären Zellen höhere Expressionswerte von Zytokinen erzielt werden als in den polynukleären Zellen oder im Vollblutansatz. (Fradin et al., 2007)

Monozyten werden von Zytokinen wie z.B. TNF- α , Interleukinen oder Interferonen aktiviert und setzen u.a. reaktive Sauerstoffspezies frei. Man spricht in diesem Fall auch von „oxidative burst“. Die induzierte inflammatorische Antwort umfasst zudem die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, welche die Entzündungsreaktion unterhalten. Bei geschwächter Immunlage des Erkrankten kann sich im Verlauf einer fortschreitenden Gewebeschädigung und bei weiterer Progression eine Organminderfunktion oder ein Organversagen bis hin zum septischen Schock entwickeln. (Feezor et al., 2003)

Die Auswahl der Mediatoren zur Stimulation - Lipopolysaccharid (LPS, Serotyp B4) und Tumor-Nekrosefaktor alpha (TNF- α) - wurde u.a. unter dem Aspekt getroffen, dass zur Vereinfachung des Modells sowohl ein exogener (LPS, B4) als auch ein endogener Stimulus (TNF- α) beurteilt und diese verglichen werden soll. Unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung für und ihrer Beteiligung an essentiellen Schritten der proinflammatorischen und stressinduzierten Signaltransduktion, dem Fehlen allfälliger Kenntnis sowie vorliegender örtlicher Expertise wurden beide Stimulantien zur detaillierten Untersuchung des Genexpressionsmusters ausgesucht. Dabei kam LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und bereits bekannter potenter Mediator einer Inflammationsreaktion in Betracht. Der zweite Stimulus TNF- α wurde gewählt, weil durch dieses intra- und interzelluläre proinflammatorische Zytokin aus der Pathophysiologie bekannte Reaktionen ausgelöst werden, die reproduzierbar und vergleichbar sind.

Andere interessante Mediatoren wie z. B. IL-6, IL-1 β , IL-8 kamen nicht zum Einsatz, um die Effekte proinflammatorisch wirkender Mediatoren vereinfacht und exemplarisch im Modell darzustellen und zu vergleichen.

Dieses *in-vitro* Modell lässt allerdings außer Acht, dass multiple, im menschlichen Organismus physiologische Prozesse regelhaft parallel ablaufen und parakrin wirksam sind und somit Einfluss auf die Inflammationsreaktion nehmen.

Zum genaueren Verständnis und zur Aufklärung der Pathophysiologie der durch Selen modulierten Immunantwort bei Inflammationsprozessen wurde aufgrund der bisher nicht vorliegenden Daten ein Versuch mit immunkompetenten Zellen unter kontrollierten Laborbedingungen ausgewählt.

5.1. DURCHFÜHRUNG VON GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS MICROARRAY-TECHNOLOGIE

Um eine große Anzahl von Genen und deren Expression simultan zu untersuchen, stellte sich in den letzten Jahren die Microarray-Technologie als geeignete Methode heraus. (Prucha et al., 2004) Mit Hilfe der Array-Technik konnten große Fortschritte sowohl im Verständnis von Zusammenhängen und Interaktionen im pathophysiologischen Geschehen als auch bei der Diagnostik und der Verlaufskontrolle von Therapien erzielt werden. So wurde mit Hilfe dieser Technologie bei septischen Patienten die umfangreiche inflammatorische Wirtsantwort beschrieben. (Prucha et al., 2004) Für die Expressionsanalysen im Rahmen von Entzündungen konnten spezielle, mit Sonden inflammationsrelevanter Gene bestückte Microarrays etabliert werden. Eine weitere Anwendung beschrieb Bullinger et al., (2004). Hierbei konnten Untergruppen der akuten myeloischen Leukämie erkannt werden, die letztlich Einfluss auf eine erfolgreiche individuelle Therapie nahmen. Auch in der Erforschung und Diagnostik der Rheumatoiden Arthritis fand die Microarray – Technologie Anwendung. (Auer et al., 2007) Tomic et al. konnten u. a. mit Hilfe von Microarrays die inflammationsbedingten Expressionsmuster in zirkulierenden Leukozyten bei Patienten beschreiben und interpretieren, die herzchirurgisch mit (*on-pump*) und ohne (*off-pump*) Herz-Lungen-Maschine (HLM) einen koronaren Bypass erhielten. (Tomic et al., 2005) Dabei stellte sich heraus, dass bei Operationen ohne HLM die perioperative inflammatorische Antwort bei gleichem Ausmaß eine verzögerte Kinetik aufweist. Transkripte von Genen mit Beteiligung für die Zell-Kommunikation, Signaltransduktion, Zelladhäsion, Immunantwort und der Apoptose wurden in diesem Experiment herausgearbeitet. Die Resultate der Hyperexpression ließen dabei eine Begünstigung der gewebeabhängigen inflammatorischen Antwort bei *on-pump* Operationstechnik vermuten. In der Arbeit von Setzer et al. konnte mittels

dieses Instruments ein Zusammenhang zwischen Hämostase und Inflammationsgeschehen in der mononukleären Zelllinie (MonoMac-6) dargestellt werden. Dabei führten die Mikrovesikel zu einer Aktivierung von inflammationsrelevanten Genen in dieser Zelllinie. (Setzer et al., 2006)

Eine ebenfalls sehr interessante Arbeit liegt von der Gruppe um Calvano vor. Hier wurde eine globale Genexpressionanalyse von menschlichen Leukozyten durchgeführt, um neue Kenntnisse eines funktionellen Netzwerkes bei Inflammationsreaktionen zu gewinnen. Nach der Applikation von Endotoxin an gesunden Probanden wurden deren Leukozyten in ihrem Genexpressionsmuster mit Hilfe der Microarray-Technologie untersucht und in Zusammenhang mit den bereits bekannten genomweiten Interaktionen gebracht. Überraschenderweise zeigte sich in diesen Experimenten, dass es entgegen den Erwartungen nach der Stimulation mit LPS zu einer transienten Herunterregulierung von sehr vielen Genen kam. Bisher wurde eine Aktivierung der Gene mit ihrer Hochregulierung in Zusammenhang gebracht. Nach 24 Stunden entsprach jedoch das Expressionsmuster der Leukozyten der Endotoxingruppe dem der unbehandelten Kontrollgruppe. (Calvano et al., 2005)

Eine kürzlich erschienene Arbeit untersuchte mit Hilfe der Microarraytechnologie die Genexpression bei Patienten, die sich eine Infektion mit dem *Mycobakterium tuberculosis* zuzogen. Aus den Daten der Analyse konnte eine Unterscheidung der Verlaufsform, latent vs. manifest, sowie Aussagen über die Prädisposition generiert werden. Eine besondere Rolle spielen dabei Interferon vermittelte Signale. (Berry et al., 2010)

Aus dem bisher Untersuchten ergaben sich folgende Fragen:

Wie verändert sich die Genexpression in mit präinflammatorischen Mediatoren stimulierten, immunkompetenten mononukleären Zellen nach der Präinkubation mit Selen?

Kann man eine Vorhersage treffen, welche Regulationsmechanismen der Transkription durch Selen moduliert werden?

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde der Microchip LabArraytor 500 - 2 verwendet, dabei handelte es sich um einen Chip mit vorselektierten inflammationsrelevanten cDNA-Sonden. Dieses ausgewählte Spektrum

bestimmter cDNA bzw. Oligonukletide auf den Microarrays lässt natürlich eine genomweite Beurteilung von Veränderungen anderer Gene und deren Expressionsmuster, wie im vorliegenden Falle die Reaktionen auf Selen, nicht zu. Zudem können Versuchsreihen unter *in vitro* Bedingungen oft nur eingeschränkt Fragen klären, jedoch wichtige Anhaltspunkte für weitergehende wissenschaftliche Untersuchungen liefern sowie dem Kliniker im Verständnis der Pathophysiologie dienen.

Eine weitere Herausforderung und ein besonderer Anspruch bestehen in der Auswertung der sehr großen Rohdatenmenge bei Microarray – Experimenten sowie in der Erkenntnis der Datenmuster nach entsprechender statistischer Beurteilung.

Zur Validierung der im Microarray-Experiment ermittelten Daten wurde als unabhängige und konventionelle Methode eine semiquantitative PCR durchgeführt. Da sich die Resultate beidseitig bestätigten (siehe Abbildung 10), kann von vertrauenswürdigen Genexpressionsdaten ausgegangen und die Chip – Hybridisierung als gelungen betrachtet werden.

Pathophysiologisch ist die Inflamationsreaktion, aber auch die Therapie, ein dynamischer Prozess. Um diesen zu erfassen und beschreiben zu können, ist die Microarray-Analyse, wie oben bereits erwähnt, eine geeignete Methode, jedoch erreicht sie aber als eine Art „Momentaufnahme“ auch ihre Grenzen. Zur Darstellung und für das Verständnis dieses Prozesses erscheinen daher geeignete Intervalle notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde die Präinkubationszeit mit Selenit auf 16 Stunden festgelegt. Nach vierstündiger Stimulationszeit mit den proinflammatorischen Mediatoren erfolgte die Zuführung der Zellen zur RNA-Isolation.

Ein weiterer Punkt bei der Be- und Auswertung sollte wie bei allen Ergebnissen über das Expressionsverhalten von Genen auch bei der Microarray-Technologie berücksichtigt werden: Ein direkter Rückschluss von der Ebene der Transkription in immunkompetenten Zellen auf die biologische Funktion ist oft nur bedingt möglich und sollte nicht absolut erfolgen. Oft ist es Ausdruck dessen, dass interzelluläre Kommunikation im Kontext einer globalen Immunreaktion besteht. Dieses Phänomen wird zum Beispiel durch die Arbeit

von Fradin et al. im Zusammenhang mit Infektion durch *Candida albicans* untermauert. (Fradin et al., 2007)

5.2. INTERPRETATION DER EXPRESSIONSANALYSEN

5.2.1. DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION IN MONONUKLEÄREN ZELLEN NACH STIMULATION MIT PROINFLAMMATORISCHEN MEDIATOREN

Die Stimulation von isolierten monozytären Zellen des peripheren Blutes mit den proinflammatorischen Mediatoren LPS B4 sowie TNF- α zeigte in den Genexpressionsanalysen ein typisches Muster. Ein überwiegender Teil wurde wie erwartet durch die Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren hoch reguliert, wobei der Anteil an der Gesamtprobe, der durch TNF- α herunterregulierten Gene deutlich größer ist. Dies ist möglicher Ausdruck dessen, dass TNF- α selbst als ein sehr potenter sowohl intra- als auch interzellulärer Botenstoff gilt. Durch LPS wird zunächst die TNF- α -Ausschüttung ausgelöst, im Weiteren erfolgt durch gebildetes TNF- α die Aktivierung folgender Signalkaskaden (z.B. NF- κ B).

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten der Expressionsanalyse korrelieren mit den Ergebnissen der Untersuchungen von Prucha und Kollegen zu Expressionsveränderungen von inflammationsrelevanten Genen. (Prucha et al., 2004) Zudem war ebenfalls eine Einteilung der Gene in Gruppen möglich (Up-regulated vs. Down-regulated). Zu den stärker exprimierten zählten u. a. PF4, ACTB, TGFB1, IL18, MAP3K14. Die herunter regulierten Gene umfassten z. B. CASP5, CD74, LTBP1, IL6ST, VAMP und IL-8RA.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der bereits erwähnten Untersuchung von Calvano, in der eine Vielzahl von Genen herunterreguliert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nach der Stimulation mit LPS eine deutliche Überexpression von Genen beobachtet werden. Diese Beobachtungen korrelieren nicht mit Calvanos Ausführungen, es könnte jedoch damit im Zusammenhang stehen, dass hier ein Chip verwendet wurde, auf dem eine indikationsbezogene Auswahl an inflammationsrelevanten Genen aufgetragen war.

5.2.1. DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION IN MONONUKLEÄREN ZELLEN NACH PRÄINKUBATION MIT SELENIT UND STIMULATION MIT PROINFLAMMATORISCHEN MEDIATOREN

Durch die Präinkubation mit Selenit konnte ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Aus diesen Expressionsdaten lässt sich auf einen Einfluss von Selen auf die Expressionsrate von inflammationsrelevanten Genen schließen. Einige wesentliche Gene wie z.B. ATF4, ICAM1, MAP3K14, PTGS2, TLR4 und TLR 9 werden unter dem Einfluss von Selen herunterreguliert und sind möglicherweise für eine weniger ausgeprägte Entzündungsreaktion verantwortlich. Diese bestimmt letztlich die verminderte Schwere der septischen Erkrankung und den besseren Krankheitsverlauf (*Outcome*) der betroffenen Patienten. Beispielhaft sei noch einmal auf die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 eingegangen. Diese Gene sind in Gegenwart von Selenit deutlich weniger stark exprimiert (ICAM-1:TNF- α : 4,74 vs. 1,19, LPS 4,34 vs. 1,54, VCAM: TNF- α : 2,91 vs. 1,34, LPS 1,75 vs. 0,65). Dies könnte für eine weniger stark ausgeprägte endotheliale Dysfunktion einschließlich ihrer negativen Folgen für den Gesamtorganismus verantwortlich sein. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Zhang und Kollegen. (Zhang et al., 2002)

Nach der statistischen Auswertung konnte beim Vergleich der Gruppen mit und ohne Stimulation durch Selenit eine signifikante Veränderung bei den mit LPS behandelten Zellen und bei den mit TNF- α behandelten PBMC's hochsignifikante Werte ermittelt werden.

In diesem Vergleich der beiden eingesetzten proinflammatorischen Mediatoren mit und ohne Selenbehandlung ist bei TNF- α ein Unterschied ersichtlich, der sich hoch signifikant darstellt. Dies liegt womöglich daran, dass TNF- α als zelleigenes Zytokin intrazelluläre Signaltransduktionprozesse induziert und intensiviert.

In den Experimenten zeigte sich, dass die Inkubation der Zellen mit Selenit zu einem typischen Genexpressionsmuster führt. Analysen z. B. auf Proteinebene oder im Tierexperiment könnten Gegenstand weiterführender Arbeiten zur Erforschung der Wirkungen von Selen und anderer antioxidativ wirkender Substanzen werden.

Die Ergebnisse des Microarray - Experimentes ließen sich mit Hilfe der sq-RT-PCR gut reproduzieren und spiegelten in der Gelelektrophorese die Werte aus der Genexpressionsanalyse mittel Array wider. Daher kann von einer erfolgreichen Hybridisierung und validen Werten ausgegangen werden.

Mit diesen Daten konnte die Hypothese bekräftigt werden, dass Selen auf antiinflammatorische Prozesse Einfluss nimmt. Die klinisch beobachtete Reduktion der Mortalität könnte sich u.a. durch diese Wirkung auf die differentielle Genexpression auf molekularer Ebene erklären lassen.

Das Verständnis für die modulierenden Effekte des Selens wird umfassender und könnte so Selengaben möglicherweise im klinischen Einsatz bei Patienten mit einer Inflammationsreaktion zu einer Therapieoption werden lassen.

5.3. PROMOTERANALYSE – HINWEISE ZUR REGULATION DER TRANSKRIPTION

Die Genexpression beim Menschen oder höheren Eukaryoten wird durch Bindung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren an das *cis*-Ende eines Gens beeinflusst. Unterschiedliche Kombinationen der Faktoren in verschiedenen Gewebetypen und Entwicklungsstadien haben entsprechende Genexpressionsmuster und sind Ergebnis eines komplizierten Prozesses. Zunächst wird der DNA-Histon-Komplex geschwächt und somit die Genexpression initiiert. Dabei spielen Methylierungen, Phosphorylierungen u.a. von DNA-Basen eine wesentliche Rolle. Die Methylierung stellt eine redox-sensitive Reaktion dar und ist mit dem Glutathionstoffwechsel eng verknüpft. Die Mechanismen zur redox-sensitiven Modifizierung sind jedoch in vielen Fällen noch nicht konkret geklärt. Nach der Auflösung der Nukleosomenstruktur kann sich im Verlauf am Promoter des zu exprimierenden Genes der Initiationskomplex ausbilden. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird hierbei u. a. durch reversible Phosphorylierung beeinflusst. (Karin M, Ben-Neriah, 2000)

Ähnliche kovalente Veränderungen von Transkriptionsfaktoren können auch durch Veränderungen des zellulären Redoxstatus einhergehend mit oxidativem Stress, ausgelöst werden. So zählen NF- κ B, Elk-1, HIF-1, SP-1 u.a. zu den redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren. (Sen, 1998)

Jozsef beschrieb, dass Selen eine Auswahl von Transkriptionsfaktoren moduliert. (Jozsef et al. 2003) Blessing et al. zeigte die direkte Wirkung von Selen auf die Genexpression und Effekte des Selens durch Interaktion mit den Zink-Finger-Domains auf DNA-Reparaturmechanismen. (Blessing et al., 2004) Außerdem wurde die von Selen beeinflusste Bindungsaktivität der Zink-Finger-Proteine, myc-Proteine und den mit ihnen assoziierten Faktoren ATF und CREB-Proteinen sowie ihrer korrespondierenden Bindungsproteine und ebenso die Proteine der DNA-Synthese – Inhibitoren Familie beschrieben. Viele dieser Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation bestimmter intrazellulärer Vorgänge wie z. B. des Zellzyklus, der Induktion von Apoptose, der Zelldifferenzierung und Immunabwehr, wobei die differentielle Expression dieser Transkriptionsfaktoren ebenfalls das Ergebnis der Transkription einer Reihe anderer Gene darstellt. Diese zusätzlichen Mechanismen bei der Regulierung der Gene stellen auch antiinflammatorische Effekte durch Selen dar und zeigen auf, dass das Spurenelement vielfältige Schlüsselrollen spielt.

Um weitere Aspekte des Netzwerkes der Regulationsmechanismen von Transkription unter Seleneinfluss näher zu untersuchen, konnte in dieser Arbeit mit Hilfe einer *in-silicio* Promoteranalyse das Vorkommen und die Häufigkeit der möglichen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren erforscht werden. Für diesen Zusammenhang lagen bisher noch keine Daten vor.

5. 4. REGULATION DER TRANSKRIPTION

Zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen der Transkription und zur Klärung der Frage, ob Gene in ihrem 5'- flankierenden Regionen – also ihren potentiellen Promoterbereichen – selen-sensitive *cis*-regulatorische Elemente enthalten, wurden zunächst vergleichende *in-silicio* Analysen von den Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Bei dieser Suche wurden zunächst die verfügbaren Daten zur Funktionalität der verschiedenen Promoterelemente nicht berücksichtigt. Bei der Auswertung mit Hilfe des MatInspectors wurden die ersten 500 Basenpaare ausgehend vom 5'- Ende *upstream* analysiert und die Häufigkeit der Bindungsstellen ermittelt. Man muss hier kritisch erwähnen, dass so die nach den 500 Basenpaaren vorkommenden

Bindungsstellen außer acht blieben, jedoch auch zu bemerken ist, dass mit zunehmender Entfernung vom Initialkomplex die Einflussstärke auf die Transkription abnimmt. (Dieterich et al., 2004)

Drei verschieden regulierte Gruppen von Genen konnten eruiert werden: Auf der einen Seite wurden Gene ermittelt, die sich in ihrer Expression unverändert zeigten und zur Gruppe der „*housekeeping*“-Gene zählen. Des Weiteren ließen sich die anderen beiden Gruppen in selen-sensitive von den selen-in-sensitive Genen differenzieren.

Durch die „*in-silico*“-Promoteranalyse konnte ein möglicher Einfluss von Selen auf verschiedene Transkriptionsfaktoren und damit auf die differentielle Expression von inflammationsrelevanten Genen gefunden werden. Daraus ergeben sich möglicherweise molekularbiologische Erklärungsansätze für den Einsatz von Selen bei septischen Erkrankungen.

Regulator/Zielgen-Beziehungen können zwar mit bioinformatischen Hilfsmitteln untersucht, müssen aber durch aufwändige experimentelle Prozeduren validiert werden, da *in silico*-Vorhersagen noch nicht zuverlässig genug sind, um mit hoher Sicherheit funktionelle Zielsequenzen für Regulatorproteine von zufälligen oder im untersuchten Kontext irrelevanten potenziellen Bindestellen im Promoter eines Gens zu differenzieren. Die Überprüfung der vorhergesagten Werte erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch eine semiquantitative PCR anhand dreier Gene SF3B3, ALOX5AP, SMPD1, entsprechend den drei Gruppen, sowie an dem „*housekeeping-gen*“ GAPDH. Die Banden in der Gelelektrophorese bestätigten das Ergebnis aus der Promoteranalyse. Bei dem untersuchten *housekeeping*-Gen GAPDH sowie dem seleninsensitiven Gen SMPD1 sieht man beim Vergleich der Amplifikationsprodukte keine Veränderungen in Gegenwart von Selen. Dagegen stellen sich die Banden der Amplifikationsprodukte, der als selen-sensitiven ermittelten Gene SF3B3 und ALOX5AP in den mit Selen behandelten Proben leicht abgeschwächt dar. Somit konnte die Analyse der Bindestellen der Transkriptionsfaktoren zum besseren Verständnis der Regulation der Transkription beitragen.

5.5. ÜBERPRÜFUNG DER ERGEBNISSE IM TIEREXPERIMENT

Aus der Literatur ist eine heterogene Datenlage einer möglichen Substitutionstherapie von Selen zu entnehmen. Zur Konzeption einer multizentrischen Patientenstudie wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein tierexperimentelles Modell konstruiert und durchgeführt. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit ein Unterschied zwischen einer Bolus- versus einer Mehrfachapplikation von Na-Selenit im Modell der CLP-induzierten Sepsis der Maus besteht (*Cecal-Ligation-and-Puncture*).

Bei diesem Modell wird während einer Laparatomie das Zökum aufgesucht, legiert und punktiert. Durch den Austritt von Darminhalt entwickeln die Tiere im weiteren Verlauf eine Peritonitis. Die Tiere erhielten intra – bzw. postoperativ Selen, zudem wurde das Präparat intraperitoneal oder – venös verabreicht. Die Dosis wurde gewichtsadaptiert 2000µg/70 kg KG bzw. 500 µg/70 kg KG bei der Mehrfachapplikation (4 – fach) appliziert.

Die Ergebnisse wiesen eine erwartete Sterblichkeit in den operierten Kontrollgruppen auf, die scheinoperierten Tiere zeigten keine Sterblichkeit über sieben Tage, unabhängig von der Applikationsform des Selens. Die operierten Tiere, die einen Selenbolus erhielten, hatten eine ähnliche Sterblichkeitsrate wie die Kontrollgruppen, bei der intraperitonealen Applikation wurde sogar eher eine Übersterblichkeit registriert. Eine im Intervall applizierte, gewichtsadaptierte Selendosis sowie die Mehrfachapplikation der Gesamtdosis auf viermalige Injektion bewirkten einen lediglich geringen Effekt auf die Sterblichkeit der untersuchten Mäuse.

Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen und wurde eingehender betrachtet. Die festgestellte Übersterblichkeit nach Gabe eines Selenbolus könnte als unerwünschte Wirkung bezüglich einer Hemmung des bei der Wirtsantwort essentiellen *oxidative burst* aufgrund der Applikation in das gleiche, von der Entzündungsreaktion betroffene Kompartiment interpretiert werden. Die kritische Durchsicht der Literatur ergab, dass nur vereinzelte Berichte über eine Veränderung des Plasma-Selenspiegels von Mäusen bei einer akuten Inflamationsreaktion/ systemischen Infektion vorliegen. Gleichmaßen ist es nicht möglich, beim gewählten Design im beschriebenen Experiment *post-hoc* Bestimmungen der Plasma-Selenspiegel durchzuführen.

Es ist anzunehmen, dass aufgrund der reichlichen Selen-Supplementation durch die Standard-Diät der Tiere keine kurzfristigen Veränderungen der Selenspiegel unter den gewählten Bedingungen nachzuweisen sind. Die Selenkonzentration im verwendeten Tierfutter wurde durch fachgerechte Analyse im Bereich zwischen 172 und 339 ppm bestimmt. Es ist daher anzunehmen, dass die Tiere einen kontinuierlichen Selenüberschuss vorwiesen und nicht wie bei Patienten einer septischen Erkrankung an einem Defizit leiden. (Forceville et al., 1998) Bei einer Wiederholung des Experimentes müsste man den Tieren einen selenfreie bzw. -reduzierte Nahrung anbieten, um optimierte Bedingungen in diesem Modell zu schaffen. Einen wesentlichen Punkt stellt in diesem Zusammenhang auch die mögliche Toxizität des Selens dar. In einer Arbeit von Spallholz et al. wurde dabei auf die prooxidativen Eigenschaften des Selens eingegangen. (Spallholz et al., 1997) Dabei entstehen durch die Oxidation selenhaltiger Proteine freie Radikale, die oxidativen Stress unterhalten und verstärken. Ein Einfluss auf die Apoptoseinduktion, allerdings im Mauskeratinozyten, durch Selenit und Selenocystamin wird ebenfalls diskutiert. (Steward et al., 1999) Letztlich ist es eine Frage der Dosis.

5.6. ANDERE ANITOXIDANTIEN IM KLINISCHEN EINSATZ

Bei kritisch Kranken wurde eine Dysfunktion des antioxidativen Schutzsystems festgestellt, da es durch die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zu einer Erschöpfung der körpereigenen, antioxidativen Kapazität kommt. Der Organismus befindet sich in diesem Zustand im sogenannten oxidativen Stress. Um diesen bei Patienten mit systemischer Inflammation zu minimieren und die Folgen der schädlichen Wirkungen (z.B. Membran- und Gewebeschädigung bis hin zum Organversagen) einzudämmen, wurden ihnen Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C und E aber auch N-Acetylcystein verabreicht.

In der Metaanalyse von Heyland et al., die sieben Studien kleinerer Fallzahl umfasste, konnte jedoch kein Effekt der untersuchten Substanzen auf die Mortalität bei kritisch Kranken herausgearbeitet werden. (Heyland et al., 2005 u.

2007) Ein weiteres Ergebnis dieser Metaanalyse war jedoch, dass sich durch eine Therapie mit Selen bei der Behandlung septischer Patienten ein positiver, aber nicht signifikanter Trend nachweisen lässt. So konnte z.B. die Inzidenz des akuten Nierenversagens mit notwendiger Hämodialyse reduziert werden. (Angstwurm et al., 1999; Gärtner et al., 2001) Zudem wurde durch Gärtner et al. gezeigt, dass durch die Substitution von Selen in Kombination mit anderen Antioxidantien bei Patienten nach schweren Traumata und Verbrennungen eine signifikant geringere Anzahl an Sekundärinfektionen einschließlich einer Sepsis auftraten. (Gärtner et al., 2001)

In der Studie von Paterson et al. ist eine verminderte NF- κ B-Aktivierung durch N-Acetylcystein bei Patienten mit Sepsis beschrieben worden. Damit verbunden war auch ein verminderter IL-8-Spiegel, jedoch nicht die Produktion der Zytokine IL-6 oder des löslichen ICAM-1. (Paterson et al., 2003)

Eine interessante Studie von Hou et al. belegte die Reduzierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und der Komplementaktivierung durch die Hemmung der Rückkopplung zwischen Neutrophilen und Komplementsystem mit Selen und Vitamin E. (Hou et al., 2000)

6. SCHLUSSFOLGERUNG

Nach der Stimulation von immunkompetenten Zellen mit den proinflammatorischen Mediatoren LPS und TNF- α konnte nach der Präinkubation mit Na-Selenit ein modulierte Genexpressionsmuster von inflammationsrelevanten Genen mit Hilfe der Microarray-Technologie dargestellt werden.

Durch die *in silicio* Analyse der Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren (TFBS) kann eine Vorhersage von den durch Selen beeinflussbaren Genen getroffen werden. Somit sind auch Rückschlüsse auf die Regulation der differentiellen Genexpression möglich.

Zudem können aus den Ergebnissen der Genexpressionanalyse weitere Arbeiten zur Klärung der Wirkung von Selen z. B. auf Proteinebene oder im Tierexperiment und den Einfluss auf die Letalität von kritisch Kranken resultieren.

Durch den modulierenden Einfluss von Selen kann möglicherweise die klinisch beobachtete Reduktion des akuten Nierenversagens und der Letalität erklärt werden. Klinische Studien mit einer größeren Population kritisch Kranker sollten im Verlauf zur Evidenz des Einsatzes von Selen bei SIRS und septischen Krankheitsbildern empfohlen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- ACCP/SCCM-Konsensus-Konferenz-Kriterien. 1992.** American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 20 (6):864-874.
- Aird WC. 2003.** The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrom. *Blood*, 101 (10):3765-3777.
- Angstwurm MW, Schottdorf J, Schopohl J, Gaertner R., 1999.** Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome. *Crit Care Med*. Sep;27(9):1807-13.
- Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J, Gärtner R. 2007.** Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med*. Jan;35(1):118-26.
- Auer J, Bläss M, Schulze-Koops H, Russwurm S, Nagel T, Kalden JR, Röllinghoff M, Beuscher HU. 2007.** Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*.;9(5):R94.
- Bauer M., Brunkhorst F., Welte T., Gerlach H., Reinhart K. 2006.** [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist*; 55:835-845.
- Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; 2001.** Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. Mar 8;344(10):699-709.
- Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, Wilkinson KA, Banchereau R, Skinner J, Wilkinson RJ, Quinn C, Blankenship D, Dhawan R, Cush JJ, Mejias A, Ramilo O, Kon OM, Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A. 2010** An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, Aug 19;466(7309):973-7
- Beutler B, Rietschel ET. 2003.** Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol*. Feb;3(2):169-76.
- Blessing H, Kraus S, Heindl P, Bal W, Hartwig A. 2004.** Interaction of selenium compounds with zinc finger proteins involved in DNA repair. *Eur J Biochem*. Aug;271(15):3190-9.
- Brazma A, Vilo J. 2000** Gene expression data analysis, *FEBS Lett*. 25 17-24
- Börner J, Zimmermann T, Albrecht S, Roesner D., 1997.** Selenium administration in severe inflammatory surgical diseases and burns in childhood, *Med Klin (Munich)*. Sep 15;92 Suppl 3:17-9.
- Bone RC, Fischer CJ, Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA, 1989.** Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med*, 17 (5):389-393.

- Brazma A**, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. **2001**. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 29(4):365-71.
- Bullinger L**, Dohner K, Bair E, Frohling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Dohner H, Pollack JR. **2004**. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* Apr 15;350(16):1605-16.
- Burk RF**, Hill KE, Motley Ak, **2003**. Selenoprotein metabolism and function: Evidence for more than one function for Selenoprotein P, *J Nutr*, 133 (Suppl 1): 1517S-20S.
- Calvano SE**, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF; Inflamm and Host Response to Injury Large Scale Collab. Res. Program. **2005**. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* Oct 13;437(7061):1032-7.
- Camerer E**, Kolsto AB, Prydz h. **1996**. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*, 81 (1):1-41.
- Chen JJ**, Boylan LM, Wu CK, Spallholz JE, **2007**. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors*;31(1):55-66.
- Chomczynski P.**, Sacchi N., **1987**. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction., *Anal Biochem* Apr ,162 (1):156-9.
- Cohen J.**, The immunopathogenesis of sepsis. **2002**. *Nature.* Dec 19-26; 420(6917):885-91.
- Coughlin SR.** **2000**. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407 (6801):258-264.
- Dempfle C.-E.** Borggreffe M., **2006**, Disseminierte intravasale Gerinnung. *Intensivmed* 43:103-110.
- Demple B.** A bridge to control. *Science.* 1998 Mar 13;279(5357):1655-6.
- Dieterich C**, Rahmann S, Vingron M. **2004**. Functional inference from non-Random distributions of conserved predicted transcription factor binding sites. *Bioinformatics.* Aug 4;20 Suppl 1:I109-I115.
- Engel C**, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. **2007**. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* Apr;33(4):606-18.
- Esmen CT.** **2005**. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.* Nov;131(4):417-30.
- Feezor RJ**, Oberholzer C, Baker HV, Novick D, Rubinstein M, Moldawer LL, Pribble J, Souza S, Dinarello CA, Ertel W, Oberholzer A.. **2003**. Molecular characterization of the acute inflammatory response to infections with gram-negative versus gram-positive bacteria. *Infect Immun.* Oct;71(10):5803-13.

- Forceville X.**, Vitoux D, Gauzit R, Combes A, Lahilaire P, Chappuis P., **1998**. Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients. *Crit Care Med.* Sep;26(9):1536-44.
- Forceville X.**, Aouizerate P, Guizard M., **2001**. Septic shock and selenium administration, *Therapie.* Nov-Dec;56(6):653-61.
- Forceville X.**, **2006**. Seleno-enzymes and seleno-compounds: the two faces of Selenium, *Crit Care.*;10(6):180.
- Forceville X.**, Laviolle B, Annane D, Vitoux D, Bleichner G, Korach JM, Cantais E, Georges H, Soubirou JL, Combes A, Bellissant E. **2007**. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Crit Care.*;11(4):R73.
- Fradin C.**, Mavor AL, Weindl G, Schaller M, Hanke K, Kaufmann SH, Mollenkopf H, Hube B. **2007**. The early transcriptional response of human granulocytes to infection with *Candida albicans* is not essential for killing but reflects cellular communications. *Infect Immun.* Mar;75(3):1493-501.
- Gärtner R.**, Angstwurm M.W., Schottdorf J..**1997**. Selensubstitution bei Sepsispatienten. *Med.Klin.* 92 (Suppl.III), 12-14.
- Gärtner R.**, Albrich W, Angstwurm MW. **2001**. The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. *Biofactors.*;14(1-4):199-204.
- Gärtner R.**, Gasnier BC, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MW. **2002**. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* Apr;87(4):1687-91.
- Geoghegan M.**, McAuley D, Eaton S, Powell-Tuck J. **2006** .Selenium in critical illness. *Curr Opin Crit Care.* Apr;12(2):136-41.
- Henneke P.**, Golenbock DT. **2002**. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med.* May;30(5 Suppl):207-13.
- Heyland DK.**, Dhaliwal R, Suchner U, Berger MM. **2005**. Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patient. *Intensive Care Med.* Mar;31(3):327-37. Epub 2004 Dec 17.
- Heyland DK.** **2007**. Selenium supplementation in critically ill patients: can too much of a good thing be a bad thing? *Crit Care.*;11(4):153.
- Hou J.**, Wu Y, Ling Y. **2000**. Modulation of the inflammatory response through complement-neutrophil activation feedback mechanism with selenium and vitamin E *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* Dec;22(6):580-4.
- Jozsef L.**, Filep JG. **2003**. Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-8 gene and protein expression in human leukocytes. *Free Radic Biol Med.* Nov 1;35(9):1018-27.
- Karin M.**, Ben-Neriah Y. **2000**. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 18:621-63.
- Klingenhoff A.**, Frech K, Quandt K, Werner T. **1999**. Functional promoter modules can be detected by formal models independent of overall nucleotide sequence similarity. *Bioinformatics.* Mar;15(3):180-6.
- Kretz-Remy C.**, Arrigo AP. **2001** Selenium: a key element that controls NF-kappa B activation and I kappa B alpha half life. *Biofactors.*14(1-4): 117-25.
- Landry DW.**, Oliver JA. **2001**. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* Aug 23;345(8):588-95.

- Levi M**, van der Poll T, Ten Cate H, van Deventer SJ. **1997**, The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanism in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest*, 27 (1):3-9.
- Levi M**, Ten Cate H. **1999**. Disseminated intravascular coagulation, *N Engl J Med*, 341 (8):586-592.
- Levi M**, van der Poll T, Buller HR. **2004**. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 109(22):2698-2704.
- Levi M**, van der Poll T. **2004**. Coagulation in sepsis: all bugs bite equally. *Crit Care*, 8 (2):99-100.
- Medzhitov R.**, Janeway Jr.C., M.D., **2000**. Innate Immunity, *N Engl J Med*; August 3, 343:338-344.
- Markiewski M.**, Lambris J. **2007**. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind Scenes into the Spotlight, *Am. J. Pathol.*: 171, 715-727.
- Markiewski et al.** **2007**. Complement and coagulation: stranger or partners in crime? *Trends Immunol.*, 28: 184-192.
- Opal SM, Esmon CT.** **2003**. Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in pathogenesis of sepsis. *Crit Care*, 7 (1) 23-38.
- Osterud B.** **1998**. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9 Suppl 1:9-14.
- Paterson RL**, Galley HF, Webster NR. **2003** The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*. Nov;31(11):2574-8.
- Prucha M**, Ruryk A, Boriss H, Moller E, Zazula R, Herold I, Claus RA, Reinhart KA, Deigner P, Russwurm S., **2004**. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. *Shock*. Jul;22(1):29-33.
- Quandt K**, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. **1995**. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*. Dec 11;23(23):4878-84.
- Riedemann NC**, Guo RF, Ward PA. 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med*. May;9(5):517-24.
- Reinhart K, Brunkhorst FM.** **2002**. Sepsis. *Zentralbl Chir*, 127(3):161-163.
- Rivers E**, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. **2001**. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 345 (19):1368-1377.
- Sakr Y**, Reinhart K, Bloos F, Marx G, Russwurm S, Bauer M, Brunkhorst F., **2007**. Time course and relationship between plasma selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure. *Br J Anaesth*. Jun;98(6):775-84.
- Segal BH**, Romani L, Puccetti P. **2009**. Chronic granulomatous disease. *Cell Mol Life Sci*. Feb;66(4):553-8.
- Sen CK.** **1998**. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol*. Jun 1;55(11):1747-58.
- Setzer F**, Oberle V, Bläss M, Möller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Lösche W. **2006**. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: a DNA microarray study. *Platelets*. Dec;17(8):571-6.

- Spallholz JE, 1997**, Free radical generation by selenium compounds and their prooxidant toxicity. *Biomed Environ Sci.* 1997 Sep;10(2-3):260-70.
- Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC, 1999**, Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis, *Free Radic Biol Med.* 1999 Jan;26(1-2):42-8.
- Tomic V, Russwurm S, Möller E, Claus RA, Blaess M, Brunkhorst F, Bruegel M, Bode K, Bloos F, Wippermann J, Wahlers T, Deigner HP, Thiery J, Reinhart K, Bauer M. 2005.** Transcriptomic and proteomic patterns of systemic inflammation in on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting. *Circulation.* Nov 8;112(19):2912-20.
- Wallace DM, 1987.** Precipitation of nucleic acids .*Methods Enzymol.*152:41-8.
- Weigand MA., Snyder-Ramos SA., Möllers AG., Bauer J., Hansen D., Kochen W., Martin E., Motsch J., 2000.** Inhaled nitric oxide does not enhance lipid peroxidation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28: 3429-3435.
- Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW, Hartle DK. 2002** Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis.* Apr;161(2):381-6.
- Zhang G, Ghosh S., 2001.**Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest.* Jan;107(1):13-9.
- Zimmermann T, Albrecht S, Kühne H, Vogelsang U, Grützmann R, Kopprasch S. 1997.** Selenium administration in patients with sepsis syndrome. A prospective randomized study, *Med Klin (Munich).* Sep 15;92 Suppl 3:3-4.

KRITERIENKATALOG ACCP/SCCM-KONSENSUS-KONFERENZ 1992

Systemische Inflammationsreaktionssyndrom (SIRS) Sepsis, Schwere Sepsis und Septischer Schock

I Nachweis der Infektion

- Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

II Severe inflammatory host response (SIRS), mind. 2 Kriterien

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder -vesikale Messung
- Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min
- Tachypnoe (Frequenz ≥ 20 /min) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)
- Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

III Akute Organdysfunktion, mind. 1 Kriterium

- Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muß ausgeschlossen sein.
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muß als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2 \Sigma$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5 \Sigma$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.

Sepsis: Kriterien I und II.

Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III.

Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

Familie	Opt.	Position	Str.	Core sim.	Matrix sim.	Sequenz
Sox-5	0.87	1 - 17	(+)	1.000	0.997	tttaaCAATaaaatcaa
Mammalian C-type LTR TATA box	0.89	4 - 20	(+)	1.000	0.928	aacaaTAAATaacaata
Brn-2, POU-III protein class	0.92	5 - 23	(-)	1.000	0.931	acatatgtATTtattgt
CUT-homeodomain transcription factor Oneut-2	0.82	6 - 22	(+)	1.000	0.867	caataaAATCaaatatg
Brn-5, POU-VI protein class (also known as emb and CNS-1)	0.74	8 - 26	(-)	1.000	0.761	cataCATAttgattttat
Myocyte enhancer factor	0.80	21 - 43	(-)	0.800	0.800	cattagtaTAGAAttacataca
Octamer-binding factor 1	0.80	21 - 35	(+)	1.000	0.996	tgatgtTAATTcta
FAST-1 SMAD interacting protein	0.81	22 - 36	(+)	0.850	0.851	glatgtTAATTctat
POU-factor Tst-1/Oct-6	0.87	22 - 36	(-)	1.000	0.880	atagAATTaacatac
Hepatic nuclear factor 1	0.80	25 - 41	(+)	1.000	0.840	tGTTAattctatactaa
Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, tinman homolog low affinity sites	0.88	25 - 37	(+)	1.000	0.898	tgtTAATtctata
Pdx1 (IDX1/IPF1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	0.74	30 - 50	(+)	1.000	0.845	attctatataTAAtgaccttgg
Monomers of the nur subfamily of nuclear receptors (nur77, nur1, nor-1)	0.89	35 - 53	(-)	1.000	0.947	aatccAAGGtcattagtat
SF1 steroidogenic factor 1	0.95	41 - 53	(-)	1.000	0.988	aatcCAAGgtcat
Growth factor independence 1 zinc finger protein acts as transcriptional repressor	0.96	42 - 56	(-)	1.000	0.961	agaAATCcaaggtca
CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	49 - 63	(-)	0.985	0.952	gaccttgaGAAAtcc
Monomers of the nur subfamily of nuclear receptors (nur77, nur1, nor-1)	0.89	53 - 71	(+)	1.000	0.895	ttctcAAGGtcccggtcct
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	0.98	54 - 74	(-)	1.000	0.988	aaaaagcacgggaCCTTgaga
Hey-like bHLH-transcriptional repressor	0.91	58 - 72	(-)	1.000	0.942	aaagCACGggacctt
Barbiturate-inducible element	0.88	62 - 76	(-)	1.000	0.895	ataaaAAGGcacggga
AT-binding transcription factor 1	0.79	65 - 81	(+)	0.782	0.807	cggtcttttATTTatt
HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOX11, Freac-6)	0.97	69 - 85	(-)	0.954	0.973	aataaatTAATaataaag
Fork head related activator-7 (FOX11)	0.96	73 - 89	(-)	1.000	0.965	aaaaaaTAAAtaataa
Member of the vertebrate HOX - cluster of homeobox factors	0.87	74 - 90	(+)	0.780	0.873	tattTATTtatttttt
CUT-homeodomain transcription factor Oneut-2	0.82	75 - 91	(-)	0.750	0.866	aaaaaaAATAaataaat
Rat C2H2 Zn finger protein involved in olfactory neuronal differentiation	0.73	117 - 133	(-)	1.000	0.775	ctGCACtccaggctggg
Muscle Initiator Sequence	0.86	129 - 147	(-)	0.904	0.869	ccaacaTCAATgccactgca
Zinc finger / POZ domain transcription factor	0.95	217 - 227	(-)	1.000	0.960	ctgtGCCGcctg
Neuron-restrictive silencer factor	0.69	223 - 243	(+)	1.000	0.773	cacAGCAccatgccagctaa
Nuclear hormone receptor TR2, half site	0.92	297 - 315	(-)	1.000	0.924	ctcacgaGGTCaggagttc
BPV bovine papilloma virus regulator E2	0.87	315 - 331	(-)	0.852	0.886	tgaccggggcTGGTggc
BPV bovine papilloma virus regulator E2	0.87	316 - 332	(+)	1.000	0.938	ccaccacggccCGGTcac
Member of b-zip family, induced by ER damage/stress, binds to the ERSE in association with NF-Y	0.93	316 - 330	(+)	1.000	0.945	ccaCCACgcccgggtc
Hepatic leukemia factor	0.84	337 - 353	(-)	0.770	0.842	ccctattaaGAAcaac
Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, tinman homolog low affinity sites	0.88	343 - 355	(+)	1.000	0.927	tctTAATagggct
Autoimmune regulator	0.86	375 - 401	(-)	1.000	0.920	ttctgtatgggaaattcTGAAtgaaga
HMG(I)Y high-mobility-group protein I (Y), architectural transcription factor organizing the framework of a nuclear protein-DNA transcriptional complex	0.92	379 - 395	(-)	1.000	0.923	atgggaAATTctggatg
Octamer-binding factor 1	0.80	384 - 398	(-)	0.750	0.817	tglatgggAAATtct
Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	0.94	384 - 398	(-)	1.000	0.969	tgtaTGGGaaattct
Ikaros 1, potential regulator of lymphocyte differentiation	0.92	385 - 397	(-)	1.000	0.925	gtatGGGAaattc
Cut-like homeodomain protein	0.75	391 - 407	(-)	1.000	0.756	agacatttctgtATGGg
c-Myb, important in hematopoiesis, cellular equivalent to avian myoblastosis virus oncogene v-myb	0.90	401 - 413	(-)	1.000	0.945	ttCAACagacatt
cAMP-responsive element binding protein 1	0.80	403 - 423	(-)	0.766	0.820	agactattACTTcaacagaca
E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	0.80	404 - 424	(+)	1.000	0.815	gtctgttgaGTAAtagctctc
PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	0.86	408 - 418	(-)	1.000	0.871	aTTACTtcaac
Muscle-specific Mt binding site	0.90	427 - 435	(+)	1.000	0.901	agctATTTt
Interferon regulatory factor 1	0.86	427 - 445	(-)	1.000	0.880	agaaaacaGAAaataagct
Interferon regulatory factor (IRF)-related protein (NF-EM5, PIP, LSIRF, ICSAT)	0.94	434 - 452	(-)	1.000	0.974	agaaaacaGAAaagagaaa
Fork head related activator-4 (FOX11)	0.78	440 - 456	(-)	1.000	0.820	gctaagaaAACAgaaaa
Ecotropic viral integration site 1 encoded factor	0.72	441 - 457	(-)	1.000	0.749	agctAAGAAaacagaaa
Myelin transcription factor 1-like, neuronal C2HC zinc finger factor 1	0.92	449 - 461	(-)	0.909	0.930	agaaAGCTaagaa
Hepatic leukemia factor	0.84	472 - 488	(+)	1.000	0.879	actgttggtgTAACcaa
PAR-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	0.86	475 - 485	(-)	1.000	0.879	gTTACaccaac
Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	0.99	498 - 506	(+)	1.000	0.997	GTCTgggtg
MEF3 binding site, present in skeletal muscle-specific transcriptional enhancers	0.83	506 - 518	(+)	1.000	0.982	ggcTCAGgtttcc

c-Ets-2 binding site	0.86	508 - 524	(-)	1.000	0.876	gctgAGGAacctgag
----------------------	------	-----------	-----	-------	-------	-----------------

Genliste - gesamt

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
3' beta actin	NM_021803	5,38	1,66	0,55	0,17	4,76	1,54	1,32	0,58
5' beta actin	NM_021803	6,10	3,64	1,17	0,52	2,06	1,22	2,89	0,71
ACO2	XM_039448	2,90	1,15	0,68	0,31	0,64	0,34	1,21	0,17
ACTB	NM_001101	5,08	1,54	0,63	0,16	3,36	2,72	1,29	0,13
ADAM17	NM_003183	1,39	0,08	0,89	0,48	0,95	0,51	0,55	0,18
ADAM8	NM_001109	2,34	0,24	1,44	1,01	8,77	12,19	0,74	0,17
ADMR	BC034761	1,16	0,86	1,64	1,53	1,15	0,45	0,85	0,30
ADORA1	XM_001687	3,88	3,18	0,80	0,21	0,56	0,61	0,61	0,18
AHCY	XM_009475	1,87	0,45	1,10	0,46	2,18	2,46	0,73	0,16
ALOX5	XM_051958	4,25	2,37	2,38	1,95	0,86	0,39	0,53	0,17
ALOX5AP	XM_015396	2,92	2,23	0,99	0,28	0,61	0,37	1,33	0,16
ALPL	BC021289	1,72	1,02	1,17	0,98	1,01	0,18	0,62	0,15
ANPEP	XM_031354	3,69	2,54	1,20	0,06	0,98	0,66	1,54	0,55
ANXA5	U05770	2,43	1,30	0,69	0,24	2,48	1,15	3,85	0,35
APAF1	NM_013229	2,03	0,70	0,87	0,24	0,71	0,33	0,60	0,07
ARHGDIB	XM_041101	1,63	0,29	0,96	0,34	1,01	0,35	0,93	0,30
ATF1	BC029619	2,08	0,50	0,70	0,73	0,75	0,97	1,13	0,13
ATF2	XM_027216	3,22	0,98	0,95	0,21	0,52	0,45	1,64	0,84
ATF3	XM_034219	1,85	0,56	0,91	0,30	0,57	0,41	1,17	0,36
ATF4	XM_039372	4,42	3,44	2,09	1,53	1,45	0,44	1,13	0,18
ATF5	NM_012068	3,60	1,98	0,43	0,13	0,65	0,48	2,61	1,79
ATF6	XM_033972	2,71	1,57	1,41	0,34	0,99	0,41	1,07	0,03
ATF7	AK027179	3,41	0,64	3,61	2,75	0,10	0,12	0,58	0,23
ATP2B1	XM_038295	2,54	0,80	0,83	0,53	1,67	1,23	2,22	0,85
BAX	NM_138761	1,57	0,25	1,31	0,82	0,76	0,37	0,95	0,16
BCL2	XM_008738	5,74	0,18	1,18	0,32	0,55	0,43	1,02	0,36
BCL2A1	NM_004049	2,95	0,69	2,11	0,72	2,44	1,12	1,47	0,02
BCL2L1	D30746	10,35	12,95	1,76	1,36	1,80	1,18	4,90	5,65
BMP1	L35279	4,74	0,76	0,82	0,18	0,35	0,44	1,25	0,66
BMP2	AF040249	0,88	0,47	0,96	0,45	0,49	0,63	0,92	0,56
BMP4	M22490	1,84	1,17	0,70	0,40	0,66	0,36	0,96	0,44

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
BMP5	NM_021073	2,90	0,98	1,49	1,18	0,88	0,54	1,40	0,35
BMP6	XM_037854	1,53	0,23	1,36	0,57	5,97	8,06	1,17	0,00
BMP8	XM_002101	5,40	1,43	1,83	0,65	1,73	0,88	0,42	0,17
BNIP2	XM_007602	2,20	0,98	1,06	0,14	1,31	0,97	0,65	0,19
BSG	XM_114018	1,63	0,37	1,31	0,50	1,25	1,00	1,71	0,04
BST1	XM_003594	2,46	0,92	1,07	0,49	0,96	0,75	1,00	0,15
BTF3	XM_032522	1,34	0,23	0,96	0,35	1,90	1,33	0,80	0,16
BTk	NM_000061	1,84	0,30	1,36	0,52	1,36	0,33	0,62	0,20
C1QR	XM_012949	2,15	1,02	1,34	0,59	0,55	0,58	0,55	0,11
CALCA (GGR)	NM_001741	3,55	0,53	0,85	0,71	0,62	0,68	0,37	0,10
CALCA (PCT1)	XM_006209	2,72	1,06	1,00	0,68	0,89	0,92	0,46	0,26
CALCA (PCT1)	M64486	1,38	0,56	2,07	1,64	0,74	0,79	0,42	0,20
CAMKK2	XM_045933	2,46	1,26	0,41	0,08	1,01	0,47	1,42	0,60
CAPN3	BC004883	2,12	0,46	1,17	0,44	0,97	0,61	0,81	0,16
CARD15	NM_022162	2,17	0,70	0,80	0,23	1,17	0,38	0,56	0,13
CARD4	AF149774	1,53	0,28	0,74	0,24	1,24	0,74	0,72	0,06
CASP1	XM_055386	2,05	0,47	1,51	0,86	0,96	0,61	1,90	0,60
CASP10	XM_054030	1,97	0,70	0,85	0,43	1,38	0,81	1,87	2,06
CASP3	XM_054686	4,48	2,91	1,80	1,43	1,60	0,66	0,75	0,55
CASP5	NM_004347	2,91	0,09	0,76	0,54	0,75	0,34	0,91	0,27
CASP6	XM_039021	2,60	1,26	0,53	0,43	0,50	0,47	0,93	0,27
CASP7	NM_033340	2,15	0,75	1,08	0,61	0,90	0,67	1,05	0,67
CASP8	NM_033357	1,87	0,13	0,94	0,32	0,67	0,53	0,77	0,23
CASP9	XM_048852	6,08	3,03	0,73	0,80	1,27	1,34	1,76	1,47
CBFB	NM_022845	5,26	3,83	0,98	1,09	0,60	0,58	0,33	0,18
CCBP2	BC020558	1,88	0,41	2,51	2,86	1,01	0,28	0,85	0,26
CCL1	XM_038954	3,22	1,37	0,83	0,32	0,58	0,66	0,85	0,21
CCL11	XM_038957	2,39	0,52	0,90	0,33	1,17	0,38	1,89	0,77
CCL13	XM_008411	4,50	3,01	3,77	1,99	0,75	0,45	1,06	0,29
CCL14	NM_004166	3,51	1,33	1,17	0,35	1,06	0,41	3,46	1,20
CCL15	NM_032965	2,04	0,38	1,04	0,26	2,16	1,08	1,90	0,31
CCL16	AF039955	3,83	0,81	1,21	0,42	1,11	0,73	1,34	0,59

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
CCL18	NM_002988	6,07	1,12	0,85	0,29	2,39	0,36	33,22	17,22
CCL19	XM_005637	2,36	0,32	0,77	0,22	0,90	0,74	0,90	0,11
CCL2	XM_038982	4,22	2,60	1,67	0,40	1,24	0,63	2,97	1,12
CCL20	XM_002224	6,07	1,37	0,85	0,51	2,74	1,64	28,27	40,60
CCL21	NM_002989	1,17	0,63	2,05	1,02	1,48	1,63	1,19	1,22
CCL23	XM_035854	3,51	2,16	1,46	0,88	1,04	0,83	2,28	1,62
CCL25	XM_008948	2,36	0,62	1,98	1,19	0,52	0,43	0,94	0,10
CCL26	XM_088248	3,43	2,06	2,53	2,15	0,74	0,54	0,76	0,07
CCL28	NM_019846	2,19	0,73	2,01	1,09	0,81	0,68	2,22	1,34
CCL3	XM_008450	6,68	2,42	1,53	0,52	7,56	5,84	15,66	2,12
CCL4	XM_008449	21,19	11,08	1,58	0,69	8,22	7,25	15,18	12,86
CCL7	XM_012649	2,97	0,90	1,19	0,50	0,73	0,26	1,89	0,38
CCL8	XM_038982	5,29	3,31	1,23	0,85	0,39	0,26	0,74	0,25
CCND1	NM_053056	2,02	0,60	0,92	0,36	1,45	0,20	1,19	0,46
CCND3	NM_001760	1,76	0,39	0,95	0,40	0,89	0,67	1,19	0,12
CCR1	NM_001295	1,23	0,10	0,99	0,06	1,13	0,68	0,99	0,35
CCR2	XM_002923	1,11	1,00	1,30	0,53	0,70	0,54	0,50	0,20
CCR5	U54994	1,71	0,03	1,35	0,53	1,68	1,28	1,11	0,20
CCR6	NM_031409	2,04	0,22	0,38	0,21	0,91	0,17	0,65	0,33
CCR7	XM_049959	2,13	0,72	2,93	1,02	1,46	0,68	0,74	0,36
CCRL2	XM_002926	5,50	0,53	1,21	0,41	0,27	0,18	1,53	0,14
CD14	NM_000591	3,13	1,03	0,74	0,12	0,44	0,27	0,77	0,19
CD151	BC013302	2,42	1,21	0,73	0,28	0,94	0,45	2,67	1,63
CD163	Z22971	1,28	0,95	1,08	0,51	0,80	0,45	1,85	1,15
CD164	NM_006016	2,49	0,39	0,88	0,37	1,72	0,54	2,26	0,33
CD19	NM_001770	2,80	1,05	0,96	0,82	1,24	0,55	0,50	0,22
CD1A	XM_048792	1,47	0,27	1,11	0,54	0,50	0,16	0,84	0,21
CD1B	NM_001764	0,85	0,32	1,19	0,67	1,78	1,80	2,19	1,94
CD1C	NM_001765	3,25	0,74	0,90	0,32	0,53	0,47	0,76	0,18
CD1D	NM_001766	1,39	0,82	0,83	0,55	0,72	0,82	0,67	0,20
CD2	NM_001767	1,77	0,83	0,78	0,34	2,63	2,44	1,16	0,23

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
CD24	NM_013230	2,54	1,38	0,72	0,49	0,69	0,53	1,31	0,66
CD244	XM_058179	4,21	0,65	4,94	4,50	0,56	0,44	0,64	0,18
CD28	XM_002489	1,72	1,00	1,01	0,79	1,60	0,50	0,85	0,35
CD33	NM_001772	2,19	0,73	0,63	0,11	0,24	0,14	3,32	3,39
CD36	AY095373	1,83	0,82	2,00	2,03	1,12	0,15	0,52	0,02
CD36L1	Z22555	2,19	0,70	0,99	0,48	0,83	0,26	0,49	0,16
CD37	NM_001774	2,13	1,71	0,55	0,37	1,63	1,14	0,93	0,18
CD38	XM_003593	1,63	1,26	1,60	1,08	0,93	0,56	1,44	0,64
CD3E	XM_051535	11,85	8,57	1,88	2,71	1,78	0,87	2,62	4,00
CD3G	XM_006454	3,20	2,16	1,58	0,58	0,92	0,71	1,37	0,38
CD3Z	XM_043767	1,61	0,48	1,03	0,49	1,10	0,69	0,78	0,13
CD4	NM_000616	2,66	2,31	0,79	0,51	0,57	0,31	0,84	0,08
CD44	XM_030326	3,46	0,40	1,60	0,74	1,70	0,22	2,51	0,89
CD48	XM_049704	2,39	0,81	0,99	0,60	1,79	1,38	1,85	0,49
CD58	NM_001779	4,18	1,33	1,21	0,71	1,08	0,48	2,60	1,45
CD59	XM_006110	4,73	2,74	0,87	0,55	0,83	0,65	0,85	0,20
CD6	XM_043467	2,36	1,34	1,71	0,14	0,31	0,19	0,64	0,18
CD68	NM_001251	1,85	0,59	0,51	0,47	0,74	0,45	1,41	0,40
CD69	NM_001781	2,07	0,47	0,87	0,21	1,27	0,67	0,96	0,18
CD74	XM_003937	2,25	0,54	0,55	0,22	2,30	1,51	1,27	0,31
CD79B	XM_012608	15,38	9,62	2,63	2,13	2,26	2,41	0,48	0,63
CD80	XM_002948	1,56	0,30	1,09	0,46	0,51	0,26	1,26	0,24
CD81	XM_056798	2,03	0,38	0,89	0,41	0,76	0,49	1,00	0,08
CD83	XM_004500	6,99	0,91	2,78	0,59	0,74	0,37	1,33	0,68
CD84	NM_003874	5,88	6,85	2,26	0,75	2,51	1,66	1,14	0,24
CD8A	M26315	1,68	0,63	1,07	0,60	0,71	0,44	0,74	0,19
CD8B1	NM_004931	2,83	0,30	0,58	0,31	0,82	0,42	0,81	0,49
CDH5	NM_001795	2,90	1,16	1,48	1,31	1,48	1,51	1,06	0,57
CDK4	NM_000075	4,26	2,02	0,71	0,36	0,50	0,30	0,98	0,30
CDK6	NM_001259	2,27	1,36	1,78	0,50	1,19	0,93	1,37	0,39
CDKN1B	NM_004064	1,10	0,20	1,04	0,55	1,08	0,62	0,86	0,14
CDW52	XM_039086	1,15	0,32	0,64	0,41	1,04	0,42	0,67	0,09

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
CEACAM4	NM_001817	1,78	0,53	1,13	0,54	1,15	0,84	0,50	0,12
CEACAM7	NM_006890	2,15	1,43	1,44	0,82	1,05	1,01	1,57	0,99
CFLAR	XM_027978	1,99	0,19	2,17	1,56	1,01	0,38	0,68	0,27
CLIC1	NM_001288	1,80	0,21	0,32	0,15	0,93	0,39	1,65	0,52
CLK1	XM_027948	1,80	0,54	0,80	0,33	0,92	0,18	0,95	0,09
CLU	BC019588	1,83	0,76	2,16	2,21	1,14	0,32	0,85	0,22
CR1	XM_015278	2,40	0,98	1,89	1,29	0,75	0,50	1,18	0,10
CR2	NM_001877	1,37	0,49	1,29	0,35	0,96	0,30	0,83	0,30
CREB3	XM_048511	1,90	0,40	0,36	0,21	1,35	0,57	1,43	0,25
CREBL2	NM_001310	2,03	0,67	0,77	0,15	0,77	0,42	1,32	0,15
CROC4	XM_001362	1,30	0,60	0,60	0,34	1,73	0,79	0,62	0,04
CSF1	M37435	4,74	2,47	1,14	0,46	0,45	0,56	1,06	0,20
CSF1R	XM_003789	3,02	1,76	0,48	0,23	0,89	0,55	0,78	0,43
CSF2	XM_003751	2,85	1,62	1,85	0,31	0,24	0,32	1,88	1,30
CSF3	XM_049864	3,58	2,95	2,67	1,05	1,18	0,44	1,24	0,68
CSF3R	NM_000760	3,48	1,59	1,13	0,33	0,46	0,38	1,57	0,11
CSNK1D	XM_012717	1,60	0,87	1,61	0,43	1,71	1,54	1,50	0,30
CX3CL1	XM_048068	4,02	2,45	0,71	0,18	0,56	0,46	1,04	0,42
CXCL1	NM_001511	4,91	4,17	2,08	0,85	2,86	1,84	23,79	12,09
CXCL11	NM_005409	2,90	1,17	0,71	0,54	0,80	0,56	1,71	0,90
CXCL12	XM_083833	1,70	0,49	0,89	1,01	0,86	0,67	1,25	1,02
CXCL14	AF144103	1,84	0,59	1,20	0,52	0,75	0,26	0,51	0,09
CXCL3	XM_031287	3,70	2,11	1,46	0,92	1,62	1,39	3,92	2,67
CXCL5	NM_002994	2,71	0,36	1,04	0,72	0,23	0,11	0,82	0,21
CXCR4	BC020968	1,81	0,95	0,85	0,35	1,18	0,42	0,75	0,24
DAF	NM_000574	2,37	1,33	0,91	0,29	0,72	0,58	1,03	0,19
DAP3	XM_043574	1,66	0,35	1,47	0,91	1,26	0,98	0,82	0,20
DAPK1	XM_011780	2,36	0,45	1,22	0,23	0,83	0,68	1,21	0,53
DAPK2	NM_014326	2,48	1,49	1,34	1,14	0,68	0,49	0,52	0,11
DDIT3	NM_004083	1,39	0,18	1,78	1,28	1,23	0,40	0,76	0,09
DDR1	BC008716	1,11	0,67	1,29	0,58	0,48	0,48	0,73	0,20
DENTT	BC024270	3,54	0,82	0,86	0,07	0,82	0,34	1,28	0,32

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
DNAM-1	XM_008704	6,36	6,98	1,84	0,23	0,76	0,49	1,11	1,08
DPP4	XM_029300	2,02	0,75	1,03	0,28	0,55	0,50	1,87	0,50
DSIPI	BC018148	1,75	0,61	1,49	1,10	1,20	0,24	0,36	0,04
DUSP1	NM_004417	1,59	0,42	2,06	0,58	1,84	1,60	1,67	0,19
DUSP10	XM_039625	3,11	2,01	0,94	0,28	1,03	0,96	2,65	0,67
DUSP4	NM_057158	2,52	0,17	1,06	0,18	0,68	0,41	2,02	0,69
DUSP5	XM_045322	3,46	0,65	1,15	0,40	0,52	0,42	1,50	0,60
DUSP6	XM_038308	4,35	0,31	0,88	0,03	0,67	0,54	0,91	0,30
DUSP7	XM_037430	2,81	0,79	0,60	0,10	0,90	0,73	1,14	0,40
DUSP9	XM_010177	3,91	2,31	1,19	0,53	0,52	0,73	0,89	0,31
DYRK1A	NM_001396	1,68	0,11	1,07	0,73	0,64	0,59	0,97	0,28
EBAF	AF081513	4,28	2,62	1,09	0,53	0,55	0,58	0,63	0,28
EDG6	NM_003775	1,29	0,36	0,82	0,32	1,11	0,84	0,75	0,23
EGFR	XM_044653	4,41	3,84	1,27	0,65	1,25	0,97	1,46	0,51
EGR1	NM_001964	2,60	0,89	1,57	0,98	0,90	0,66	0,74	0,31
EIF3S2	XM_034520	2,92	0,82	1,21	0,63	0,68	0,50	0,99	0,45
ELK1	XM_033862	3,70	2,77	1,13	0,66	0,59	0,66	1,70	1,14
ENG	XM_055188	4,69	2,64	0,94	0,14	0,66	0,30	1,16	0,44
ENTPD1	XM_055699	1,88	0,16	2,64	1,04	2,87	2,93	0,48	0,13
F2R	XM_037260	3,11	2,60	0,99	0,43	0,71	0,48	0,92	0,44
F3	XM_001322	2,36	1,71	2,01	1,41	0,62	0,48	1,24	0,26
FASTK	NM_033015	1,18	0,13	1,05	0,51	1,28	0,36	1,19	0,41
FCER2	M14766	3,63	1,11	1,05	0,52	2,41	1,78	0,36	0,18
FCGR1A	BC032634	6,86	8,29	1,04	0,54	1,24	0,32	1,72	0,73
FCGR2B	X52473	1,33	0,61	0,84	0,23	1,10	0,84	1,11	0,30
FCGR3B	M90746	3,40	2,04	0,80	0,26	1,26	0,71	1,23	0,11
FKSG12	AF311912	1,72	0,37	0,89	0,35	0,72	0,59	1,11	0,34
FLOT1	NM_005803	2,52	1,30	0,67	0,12	2,22	1,36	1,18	0,24
FOS	XM_041060	4,11	1,95	1,64	0,30	0,78	0,89	0,54	0,07
FOSB	NM_006732	1,98	0,48	0,85	0,62	0,81	0,47	1,28	0,71
FOXO1A	XM_007189	1,87	0,39	0,89	0,37	0,59	0,35	1,61	0,64
FUT4	XM_012039	2,85	0,31	1,64	0,34	0,75	0,38	1,48	0,09

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
GDF1	XM_051414	2,44	0,90	1,72	0,45	0,45	0,35	1,51	0,54
GFRA2	NM_001495	3,19	1,85	2,52	2,11	0,69	0,84	0,75	0,23
GGH	XM_005313	5,69	5,62	4,44	4,41	0,86	0,25	0,37	0,12
GP1BA	AF395009	4,26	0,22	1,37	1,19	0,81	0,50	0,47	0,06
GUCY1B3	BC026332	2,48	1,34	1,51	0,57	0,26	0,07	0,82	0,28
GZMB	NM_004131	1,21	0,45	1,48	1,47	0,81	0,74	1,06	0,34
HBXIP	XM_059235	1,67	0,39	1,08	0,20	1,12	1,10	1,06	0,23
HEM1	BC001604	1,84	0,11	0,78	0,27	0,47	0,40	0,55	0,23
HIF1A	NM_001530	2,72	0,32	0,76	0,37	1,05	0,22	2,24	1,27
HLA-A	NM_002116	1,66	0,21	0,64	0,18	1,29	0,61	1,15	0,09
HLA-E	AF523283	1,67	0,45	0,66	0,40	1,72	0,63	1,01	0,28
HM74	NM_006018	4,54	3,47	0,55	0,09	0,62	0,51	2,34	2,23
HMGB1	NM_002128	1,68	0,71	0,89	0,29	1,32	0,46	1,01	0,12
HMOX1	NM_002133	2,15	0,40	1,03	0,57	0,91	0,93	1,15	0,49
HNRPD	AF026126	2,58	2,14	0,80	0,53	0,98	0,48	0,77	0,19
HPRT1	XM_040683	2,12	0,89	1,28	0,29	1,35	0,90	0,60	0,08
HRAS	BC006499	1,82	0,46	1,01	0,27	1,63	0,81	0,91	0,19
HSOBRGRP	NM_017526	2,28	0,69	0,42	0,21	0,89	0,21	1,35	0,86
HSPCA	NM_005348	3,11	1,06	0,50	0,33	1,16	0,44	1,90	0,23
ICAM1	XM_049516	4,74	1,32	1,19	0,51	1,16	0,73	1,54	0,93
ICAM2	XM_044428	2,29	1,46	1,77	0,83	1,21	1,04	0,79	0,09
ICAM3	XM_049531	2,01	1,13	1,01	0,36	1,01	0,50	0,88	0,27
IER3	XM_041744	3,57	0,48	1,10	0,48	2,00	0,96	4,29	2,66
IFNAR1	XM_048562	5,16	4,82	2,52	0,94	0,38	0,42	1,54	0,59
IFNAR2	XM_048555	4,27	2,71	0,74	0,47	0,50	0,44	0,82	0,39
IGKC	BC018761	7,16	10,25	0,90	0,25	0,81	0,20	1,35	0,19
IGLL1	XM_056009	2,31	0,87	0,30	0,24	0,69	0,50	0,58	0,37
IKBK	NM_003639	4,16	0,36	0,99	0,47	1,82	0,78	2,82	0,13
IL10RA	XM_006447	1,58	0,52	0,67	0,43	0,84	0,14	0,99	0,17
IL10RB	NM_000628	2,29	0,95	2,38	1,01	0,82	0,51	0,76	0,26
IL11	XM_035922	6,00	2,56	2,27	1,07	0,86	0,46	0,77	0,46
IL12A	NM_000882	7,05	7,81	0,75	0,30	1,02	0,46	0,27	0,16

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
IL12B	XM_004011	2,70	2,88	3,19	2,05	1,26	1,20	1,55	0,50
IL12RB2	NM_001559	2,33	0,58	0,97	0,70	1,44	1,52	3,37	1,94
IL13	XM_055221	4,36	2,01	1,26	0,55	0,54	0,29	0,97	0,28
IL13RA1	NM_001560	1,55	0,21	0,95	0,33	0,94	0,30	1,09	0,06
IL13RA2	Y08768	3,75	1,44	3,42	0,79	0,94	0,85	0,82	0,39
IL15	XM_003529	1,30	0,44	0,92	0,27	0,50	0,41	0,82	0,29
IL15RA	NM_002189	2,41	0,38	0,77	0,20	1,01	0,63	1,03	0,42
IL16	M90391	1,61	0,67	1,30	0,55	3,02	2,69	0,57	0,02
IL17B	AF218727	2,10	0,73	0,75	0,47	0,73	0,22	0,78	0,10
IL17BR	NM_018725	4,57	3,13	5,37	7,68	0,95	0,57	0,66	0,21
IL17D	BC036243	1,77	0,62	12,06	18,93	0,11	0,07	0,56	0,07
IL17R	NM_014339	1,66	0,37	0,86	0,59	1,03	0,77	1,17	0,10
IL18	NM_001562	2,71	0,72	1,15	0,35	0,53	0,55	0,98	0,10
IL18R1	XM_002682	1,66	0,50	1,19	0,69	0,85	0,47	0,63	0,06
IL19	NM_013371	15,03	20,08	2,24	1,21	1,02	1,31	0,36	0,31
IL1B	XM_010760	3,19	1,42	1,39	0,28	1,16	0,46	0,51	0,18
IL1R1	XM_002686	3,10	1,31	1,06	0,36	0,58	0,38	1,58	0,32
IL1R2	XM_002765	3,44	2,87	0,90	1,06	1,68	1,17	0,10	0,05
IL1RN	NM_000577	1,75	0,55	0,81	0,30	1,33	0,63	2,24	0,59
IL2	NM_000586	1,36	0,69	1,94	0,95	1,39	1,50	0,44	0,36
IL20RA	NM_014432	1,77	1,18	0,76	0,65	1,41	0,41	0,48	0,20
IL21	NM_021803	5,81	5,38	0,69	0,33	0,86	0,87	0,20	0,09
IL21R	AY064474	1,92	0,79	0,96	0,47	0,74	1,10	1,76	1,87
IL22	NM_020525	10,55	11,75	2,14	1,70	1,52	1,27	0,69	0,35
IL22R	BC029273	3,94	1,95	1,90	2,35	1,13	0,67	0,80	0,13
IL22RA2	NM_052962	1,84	0,62	1,24	0,92	0,93	1,00	0,63	0,30
IL23A	NM_016584	1,79	0,40	0,95	0,60	0,29	0,15	0,71	0,17
IL26	NM_018402	2,08	1,17	0,62	0,40	1,58	0,94	0,51	0,19
IL27W	XM_035638	2,99	0,79	0,90	0,37	1,08	0,71	1,34	0,79
IL2RA	NM_000417	2,30	1,17	1,85	0,51	1,10	0,73	0,93	0,03
IL2RG	XM_047675	3,93	0,30	1,51	0,33	2,91	1,49	1,29	0,33
IL3	NM_0005882	2,95	1,26	1,13	0,76	2,09	1,28	2,10	0,65

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
IL3RA	D49410	2,79	0,58	1,99	1,14	0,62	0,39	1,23	0,50
IL4	NM_0005892	2,78	2,05	2,79	3,62	0,69	0,69	1,63	2,34
IL4R	AF421855	6,27	4,40	3,87	4,37	3,14	3,82	0,55	0,23
IL5RA	XM_042132	2,03	0,35	1,19	0,60	0,70	0,47	5,35	5,20
IL6	XM_057491	2,79	0,68	1,62	0,41	1,20	0,47	2,94	0,91
IL6RA	XM_055737	2,11	1,78	1,15	1,06	0,65	0,83	0,72	0,59
IL6ST	NM_002184	2,00	0,79	0,81	0,26	1,65	1,26	1,55	0,51
IL7	NM_000880	1,15	0,31	1,24	0,26	1,13	0,47	0,81	0,18
IL8	NM_000584	11,46	9,14	0,34	0,22	0,52	0,69	0,86	0,61
IL8RA	NM_000634	2,17	0,27	1,25	0,42	0,82	0,11	0,90	0,05
IL9	NM_000590	3,31	3,01	2,07	1,43	1,10	1,61	0,79	0,54
IL9R	L39062	1,77	1,38	1,68	1,28	0,88	1,04	0,62	0,17
ILF1	XM_008608	1,65	0,52	0,94	0,56	0,98	0,45	0,75	0,29
INHBA	XM_042996	2,99	1,43	5,06	6,88	0,36	0,36	0,85	0,49
INHBB	XM_010807	3,40	1,30	2,30	1,51	0,49	0,30	0,90	0,15
INHBC	NM_005538	1,66	0,38	0,76	0,33	1,14	0,44	1,18	0,18
IRAK1	NM_001569	1,72	1,05	1,04	1,08	0,57	0,46	0,68	0,09
ISGF3G	NM_006084	2,27	0,53	0,84	0,49	0,99	0,70	1,92	0,78
ITGA1	XM_032902	2,30	1,31	4,52	2,95	0,89	0,13	3,17	1,72
ITGA2	XM_003913	3,47	2,83	0,89	0,51	0,67	0,28	0,61	0,05
ITGA2B	XM_045985	7,14	3,45	0,66	0,54	0,71	0,57	1,58	2,24
ITGA3	XM_008432	3,49	0,26	1,45	0,65	1,63	1,75	1,12	0,32
ITGA5	XM_028642	4,70	2,09	0,83	0,11	0,59	0,48	1,30	0,04
ITGA6	XM_002335	2,91	0,85	0,84	0,21	1,55	0,54	1,33	0,32
ITGAL	XM_046035	2,25	0,81	1,04	0,19	1,25	1,01	0,90	0,51
ITGAV	NM_002210	2,85	2,42	1,01	0,26	2,38	1,51	0,63	0,17
ITGB1	NM_002211	1,88	0,38	0,48	0,23	1,49	0,15	1,21	0,08
ITGB2	XM_036107	2,48	1,34	0,61	0,35	0,75	0,12	1,00	0,14
ITGB4	NM_000213	2,72	0,58	1,88	0,97	1,36	1,34	1,14	0,39
JUN	XM_001472	1,32	0,74	1,23	0,50	0,87	0,51	0,67	0,18
JUNB	XM_009064	1,54	0,08	0,76	0,56	1,45	0,46	2,11	0,60
KAI1	XM_031242	3,76	1,55	0,53	0,12	0,64	0,43	0,78	0,39

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
KIT	NM_000222	2,85	1,10	0,56	0,17	0,85	0,78	1,76	0,33
KLRC1	NM_007328	2,91	2,97	0,72	0,08	1,10	0,28	0,91	0,11
KLRD1	XM_046575	2,20	0,46	1,10	1,22	0,86	0,38	1,29	0,39
LAMP1	XM_052636	4,23	2,19	1,90	1,03	1,09	0,85	1,10	0,27
LAMP2	XM_036154	1,92	0,16	0,59	0,16	0,79	0,64	1,30	1,07
LAMR1	NM_002295	1,36	0,10	0,97	0,08	1,23	0,42	1,27	0,22
LBP	NM_004139	1,55	0,68	1,36	0,58	0,45	0,53	0,60	0,21
LILRA2	XM_028164	2,42	0,31	0,84	0,33	0,67	0,58	1,13	0,78
LRP1	NM_002332	1,87	0,82	1,28	0,66	0,79	0,40	0,70	0,19
LTA	XM_041844	2,17	0,74	1,09	0,17	0,69	0,43	1,14	0,36
LTB	NM_009588	1,56	0,19	1,39	0,83	1,30	0,84	1,25	0,09
LTB4R	AB008193	1,98	0,37	1,21	1,09	0,85	0,37	1,88	0,57
LTBP1	XM_016747	1,77	0,18	0,82	0,30	0,98	0,52	0,91	0,31
LTBP3	NM_021070	1,28	0,20	2,81	4,07	0,91	0,72	0,79	0,30
LTBR	NM_002342	1,50	0,81	1,72	1,44	1,03	0,69	2,73	2,65
LY64	XM_003933	1,77	0,21	1,73	0,80	0,71	0,51	0,83	0,11
LY9	XM_049749	1,54	0,16	0,71	0,33	2,30	2,72	1,18	0,36
MAP2K2	NM_030662	2,12	0,73	0,85	0,34	0,71	0,44	0,98	0,39
MAP2K3	BC032478	2,09	0,18	1,17	0,44	1,12	1,34	1,14	0,35
MAP2K4	NM_003010	2,25	0,82	1,00	0,33	0,88	1,03	0,61	0,16
MAP2K6	NM_031988	1,86	0,68	0,55	0,10	0,82	0,66	0,89	0,10
MAP3K1	XM_042066	2,18	0,49	0,90	0,58	0,50	0,45	0,88	0,23
MAP3K10	XM_042665	4,88	3,08	1,98	1,81	0,63	0,48	0,78	0,03
MAP3K11	NM_002419	2,01	0,39	2,20	0,49	0,81	0,57	1,16	0,31
MAP3K12	XM_006800	3,12	3,20	1,01	0,47	1,14	0,59	0,91	0,34
MAP3K13	XM_003016	3,00	0,62	1,07	0,36	0,78	0,26	1,50	0,73
MAP3K14	XM_008346	2,11	0,83	1,47	1,78	0,53	0,48	0,56	0,12
MAP3K2	AK027345	2,03	0,20	0,92	0,13	0,75	0,37	1,17	0,40
MAP3K3	NM_002401	2,30	1,16	1,01	0,39	0,62	0,29	1,45	0,59
MAP3K4	NM_006724	1,93	0,59	2,10	1,27	2,00	1,06	0,84	0,19
MAP3K5	XM_050441	1,31	0,79	0,95	0,20	0,81	0,72	0,90	0,19
MAP3K6	NM_004672	1,97	1,05	0,97	0,53	1,26	0,81	0,42	0,19

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
MAP3K7	AK055901	3,09	1,35	1,79	1,70	0,82	0,59	0,23	0,14
MAP3K8	XM_030523	3,27	1,16	0,17	0,06	0,75	0,63	0,76	0,96
MAPK1	XM_036966	2,95	0,82	1,69	0,26	0,85	0,55	2,45	0,31
MAPK11	XM_035889	1,08	0,57	5,42	1,61	1,36	0,88	0,61	0,13
MAPK13	XM_043359	1,00	0,61	1,76	1,09	0,68	0,62	0,64	0,23
MAPK14	NM_001315	2,72	0,20	1,22	1,03	1,05	0,17	0,50	0,17
MAPK3	BC013992	2,58	1,47	0,78	0,25	0,41	0,22	0,98	0,24
MAPK4	NM_002747	3,53	1,36	0,91	0,49	0,47	0,31	1,01	0,86
MAPK6	NM_002748	12,04	5,66	2,34	1,06	0,23	0,27	0,65	0,33
MAPK7	XM_045047	2,16	0,56	1,09	0,28	0,77	0,44	0,84	0,09
MAPK8	NM_1390491	4,58	0,95	1,66	0,47	1,45	1,04	1,32	0,82
MAPKAPK3	NM_004635	1,62	0,40	1,06	0,90	1,58	2,17	0,48	0,13
MCAM	XM_054976	2,87	1,58	0,66	0,46	0,48	0,37	0,62	0,26
MCL1	NM_021960	5,34	3,86	0,65	0,09	2,73	3,13	3,46	1,35
MEF2A	XM_057356	2,29	1,07	1,03	0,15	0,57	0,42	0,73	0,11
MEF2B	XM_053519	5,33	2,21	1,27	0,43	0,92	0,34	0,50	0,23
MEF2D	NM_005920	2,24	0,75	3,49	0,59	1,00	0,54	0,98	0,39
MIF	NM_002415	1,64	0,46	0,85	0,41	0,88	0,65	1,35	0,09
MKNK1	NM_003684	1,80	0,16	0,79	0,18	1,48	1,23	0,83	0,44
MME	NM_007289	1,71	0,42	1,88	0,93	0,83	0,73	0,72	0,35
MPL	U68162	3,39	1,64	3,38	1,10	3,93	2,07	0,64	0,18
MRC1	NM_002438	1,28	0,68	0,90	0,59	1,69	0,72	0,57	0,08
MST1R	XM_011068	1,17	1,07	0,31	0,10	0,42	0,28	0,36	0,20
MUC1	NM_002456	1,88	0,52	1,82	0,86	0,62	0,23	1,54	0,24
MYB	XM_004256	2,11	0,71	0,50	0,27	1,27	0,36	1,13	0,13
MYD88	NM_002468	2,50	0,24	0,86	0,66	0,76	0,88	1,25	0,71
NAPA	BC028234	1,93	0,68	1,02	1,10	0,27	0,04	1,39	0,33
NCAM1	NM_000615	4,67	2,40	0,46	0,04	0,82	0,27	0,53	0,07
NFATC1	NM_006162	1,63	0,63	1,15	0,88	0,56	0,58	0,70	0,08
NFATC2	NM_012340	3,22	1,03	0,38	0,17	1,18	1,48	0,54	0,17
NFATC3	NM_004555	1,96	0,64	1,04	1,06	1,52	0,89	0,92	0,09
NFKB1	AF213884	4,38	0,48	1,16	0,45	1,57	0,53	3,91	1,26

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
NFKBIA	BC004983	4,85	0,72	1,10	0,68	1,61	0,51	2,86	0,37
NOS2A	XM_034166	2,08	0,40	0,45	0,06	0,93	0,45	0,99	0,08
NQO1	NM_000903	2,80	1,51	1,15	0,52	1,01	0,79	0,84	0,49
NR3C1	XM_037862	2,04	0,79	0,69	0,16	0,95	0,15	0,93	0,12
NT5E	XM_015643	3,16	2,35	2,85	1,71	1,10	0,28	0,46	0,08
NUMB	NM_003744	1,71	0,28	1,06	0,34	0,42	0,09	1,32	0,41
OLR1	NM_002543	6,18	1,88	1,42	0,71	0,83	0,51	2,50	0,62
OSM	NM_020530	4,97	1,27	0,44	0,22	1,28	0,09	0,71	0,07
PAFAH1B1	XM_034770	2,71	1,29	0,77	0,10	0,75	0,70	1,30	0,51
PAFAH1B3	XM_029913	3,34	1,56	0,96	0,37	0,39	0,37	1,54	0,35
PCMT1	XM_027358	2,66	1,22	2,06	2,37	0,23	0,23	0,38	0,03
PCOLN3	NM_002768	1,65	0,31	1,20	0,93	0,55	0,69	0,92	0,15
PDCD5	XM_039764	2,31	1,72	0,60	0,07	1,43	0,31	1,59	0,14
PDGFRA	NM_006206	2,04	0,36	1,52	0,88	1,04	0,30	0,94	0,26
PDGFRB	XM_015815	4,75	2,92	0,62	0,24	3,28	4,54	0,79	0,39
PECAM1	L34657	1,84	0,85	0,77	0,17	0,89	0,69	0,81	0,29
PF4	NM_002619	1,05	0,12	1,01	0,08	0,74	0,44	1,04	0,27
PIK3C2B	XM_046798	2,26	1,54	1,03	0,20	0,88	0,56	3,36	4,67
PIK3C2G	XM_029791	3,56	3,35	1,01	0,10	1,07	0,81	0,77	0,58
PIK3CA	XM_037334	2,22	0,83	2,16	0,54	1,15	0,60	1,43	0,46
PIK3CB	AJ297560	2,49	0,56	0,97	0,36	1,60	0,95	1,17	0,10
PIK3CG	NM_002649	1,75	0,39	1,34	0,29	0,84	0,23	0,53	0,15
PIK3R1	XM_043864	1,41	0,40	0,89	0,26	1,47	0,31	0,64	0,07
PLA2G12	XM_039019	3,59	2,89	0,72	0,40	0,96	0,44	0,57	0,08
PLA2G2A	XM_001840	0,87	0,32	1,35	0,92	0,77	0,48	0,90	0,45
PLAUR	BC002788	4,01	1,70	0,94	0,15	0,65	0,33	2,99	1,61
PMAIP1	NM_021127	1,61	0,50	0,82	0,21	1,69	0,76	2,64	1,30
PPARA	XM_027064	1,91	0,34	0,96	0,43	0,61	0,60	1,38	0,51
PPARG	NM_005037	3,22	1,52	5,18	3,50	1,14	0,89	0,93	0,46
PPBP	NM_002704	1,46	0,34	1,00	0,63	0,71	0,50	1,11	0,09
PPIF	NM_005729	2,70	0,37	0,85	0,55	0,87	0,46	1,42	0,36
PPP1R15A	U83981	2,82	1,41	0,73	0,22	1,41	1,43	1,97	0,35

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
PRDX1	BC021683	3,53	0,87	2,68	2,39	1,06	1,08	0,90	0,32
PiL16	AF077011	2,31	0,53	0,85	0,17	0,40	0,40	0,89	0,10
PROML1	NM_006017	5,53	2,81	0,62	0,13	0,56	0,41	1,16	0,22
PTGIR	NM_000960	1,78	0,70	2,17	0,89	0,66	0,19	0,82	0,14
PTGIS	XM_030509	2,19	1,25	2,09	1,42	0,62	0,49	0,61	0,28
PTGS1	XM_044882	1,81	0,57	1,58	0,78	0,51	0,33	1,37	1,38
PTGS2	NM_000963	4,34	1,66	1,69	1,25	1,51	1,02	2,70	0,98
PTPN13	XM_031701	6,40	4,69	1,14	0,94	0,53	0,49	0,38	0,32
PTPRC	NM_080922	1,81	0,34	0,46	0,11	1,77	0,41	1,15	0,17
PTPRJ	XM_038024	2,32	0,63	3,21	3,81	0,66	0,50	1,46	0,72
PTX3	NM_002852	2,76	2,20	1,48	0,77	0,99	0,80	1,25	0,37
PVR	BC015542	3,91	1,03	1,63	0,61	1,10	0,70	1,08	0,54
PVRL2	NM_002856	2,45	0,51	0,60	0,24	0,49	0,44	1,16	0,87
RAB1A	XM_046674	2,00	0,46	1,53	0,93	0,60	0,09	1,53	0,43
RAB37	BC016615	1,56	0,91	1,22	0,60	1,36	1,11	1,19	1,28
RIPK2	NM_003821	3,95	2,36	0,82	0,57	1,02	0,34	3,08	2,19
RNASE2	NM_006068	4,22	3,38	2,31	1,96	1,28	1,00	1,42	0,32
RPL13A	XM_027885	1,28	0,28	0,71	0,32	3,46	2,63	1,04	0,07
RPS6KA1	NM_002953	1,66	0,41	1,04	0,43	0,84	0,23	1,22	0,08
RPS9	NM_001013	2,27	0,88	1,04	0,39	1,09	0,29	0,91	0,06
RUNX1	XM_048665	2,33	0,85	1,67	1,05	1,26	0,39	1,01	0,45
S100A11	NM_005620	1,83	0,26	0,97	0,52	1,01	0,33	1,58	0,29
SCYA5	XM_035842	1,29	0,06	1,03	0,51	1,11	0,36	0,94	0,12
SDC1	NM_002997	3,22	0,82	1,09	0,32	0,45	0,36	1,16	0,39
SDF2	XM_031456	1,70	1,05	1,41	0,65	0,77	0,61	1,33	0,63
SDFR1	XM_038900	2,77	0,82	1,70	1,04	0,54	0,40	2,25	0,76
SELL	XM_044442	1,73	0,34	0,87	0,26	1,63	0,79	2,10	0,34
SELP	XM_057445	2,40	2,16	0,87	0,69	1,39	1,19	1,84	0,15
SELPLG	XM_006867	1,65	0,92	0,95	0,53	0,75	0,19	0,63	0,21
SEMA4D	NM_006378	2,32	0,17	1,44	1,42	0,60	0,46	1,03	0,30
SEMA7A	NM_003612	5,44	5,50	1,78	0,61	1,97	2,05	0,91	0,63
SIGIRR	NM_021805	1,35	0,25	1,45	0,79	0,99	0,58	0,84	0,24

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
SIP	XM_040524	2,99	1,08	0,51	0,10	0,79	0,31	0,85	0,24
SLC3A2	NM_002394	1,98	0,58	1,06	0,79	0,81	0,94	1,11	0,47
SMPD1	NM_000543	1,09	0,28	1,54	1,56	0,41	0,14	0,77	0,19
SRP54	XM_055849	1,94	0,55	1,14	0,51	0,92	0,46	1,53	0,26
STAT1	XM_010893	1,60	0,55	0,55	0,21	3,76	2,40	2,86	1,18
STAT2	XM_006715	3,20	2,94	0,89	0,35	0,79	0,53	1,04	0,22
STAT3	NM_139276	2,04	0,10	0,89	0,52	0,69	0,54	2,14	2,02
STAT4	NM_003151	5,98	4,43	1,68	0,26	3,25	3,06	0,39	0,05
STAT6	NM_003153	4,56	3,40	0,77	0,28	0,71	0,41	1,04	0,17
SUI1	NM_005801	2,79	1,30	0,85	0,20	1,90	1,12	1,31	0,23
SYT5	XM_113695	2,00	1,25	1,30	1,06	0,60	0,58	0,43	0,08
TACSTD2	NM_002353	2,43	0,65	2,04	1,51	1,02	0,38	1,03	0,83
TACTILE	NM_005816	1,34	0,37	1,93	0,61	1,12	0,93	0,62	0,13
TBCA	XM_047570	1,46	0,44	1,86	0,10	0,95	0,54	1,02	0,12
TBXAS1	NM_001061	2,32	0,83	0,85	0,27	1,05	0,51	0,95	0,30
TCF8	NM_030751	1,86	0,34	0,94	0,42	1,08	0,28	1,31	0,10
TFPI2	AY044097	1,55	0,49	1,76	0,36	0,60	0,56	0,70	0,08
TGFA	NM_003236	3,17	1,48	1,66	0,27	0,63	0,47	1,78	0,25
TGFB1	XM_030906	3,14	1,17	1,93	0,30	0,68	0,35	1,18	0,16
TGFB11	BC001830	3,44	0,92	2,36	1,98	0,68	0,47	1,01	1,02
TGFB2	XM_001754	1,52	0,05	1,33	0,14	0,52	0,43	0,75	0,19
TGFB3	XM_007417	2,87	1,30	0,99	0,58	0,97	0,59	0,64	0,04
TGFBR2	NM_003242	1,94	0,13	1,02	0,38	0,59	0,45	0,79	0,33
TGFBR3	XM_001924	2,56	0,69	1,26	0,62	0,47	0,41	0,64	0,12
THBD	XM_009595	1,79	0,90	0,80	0,27	1,03	0,74	0,88	0,23
THY1	NM_006288	3,56	2,38	0,92	0,20	1,92	1,32	0,41	0,21
TIAF1	NM_004740	2,51	1,20	1,50	0,73	0,61	0,41	0,73	0,35
TIMP1	XM_055756	1,49	0,22	1,27	0,25	2,30	1,95	1,10	0,07
TLR1	NM_003263	2,21	0,43	2,12	1,48	1,27	1,26	1,19	0,10
TLR10	NM_030956	2,12	0,82	1,41	0,99	0,82	0,72	0,66	0,17
TLR2	BC033756	3,77	1,78	2,13	2,21	1,01	0,44	1,30	0,20
TLR3	NM_003265	2,59	0,58	0,72	0,35	0,94	0,83	0,92	0,15

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
TLR4	NM_138556	1,85	0,75	1,09	0,78	1,98	1,48	1,02	0,30
TLR5	NM_003268	1,05	0,50	1,88	0,97	1,28	0,42	0,74	0,39
TLR7	AF240467	1,69	0,99	0,91	0,41	0,74	0,76	1,13	1,01
TLR9	BC032713	1,84	0,36	1,37	1,18	0,88	1,01	0,40	0,17
TNF	XM_041847	4,30	1,81	1,26	0,59	0,93	0,52	3,07	1,67
TNFAIP1	BC003694	3,12	2,31	0,85	0,12	0,83	0,48	1,05	0,41
TNFAIP2	XM_007258	10,84	3,48	1,07	0,42	1,02	0,66	2,95	1,76
TNFAIP6	XM_002762	11,33	5,77	1,12	0,36	2,11	0,65	5,88	2,81
TNFRSF10B	XM_027651	2,31	1,19	1,43	0,09	0,93	0,95	1,32	0,29
TNFRSF11A	NM_003839	1,45	1,16	1,87	1,06	0,84	0,62	0,67	0,29
TNFRSF11B	NM_002546	1,63	0,98	1,70	1,88	1,17	1,56	0,39	0,14
TNFRSF14	XM_049849	1,74	0,13	0,24	0,21	0,67	0,36	1,32	0,25
TNFRSF1B	XM_054837	1,90	0,80	2,66	3,31	0,69	0,87	1,78	0,34
TNFRSF4	NM_003327	6,69	3,85	1,24	0,61	0,65	0,44	2,43	1,33
TNFRSF5	XM_057372	3,22	0,76	1,19	0,40	0,66	0,47	1,27	0,36
TNFRSF6B	NM_003823	2,28	0,99	2,29	2,68	0,99	0,44	0,70	0,04
TNFRSF7	XM_006953	1,90	0,55	0,91	0,27	0,62	0,40	0,73	0,13
TNFRSF8	NM_001243	2,58	0,35	0,70	0,03	1,09	1,05	1,25	0,98
TNFSF11	NM_033012	0,97	0,56	1,33	0,49	0,82	0,67	0,92	0,68
TNFSF12	NM_003809	1,94	0,78	1,45	0,44	1,23	0,74	0,62	0,15
TNFSF13B	XM_057131	2,13	2,34	0,73	0,14	0,92	0,38	1,93	0,81
TNFSF7	XM_056556	3,63	0,90	1,13	0,32	0,52	0,43	1,20	1,10
TNIP1	NM_006058	6,54	0,68	0,59	0,16	1,13	0,03	3,14	1,63
TOM1	NM_005488	2,39	0,46	1,38	0,07	0,99	0,61	1,20	0,43
TP53	XM_008679	6,00	5,24	1,01	0,16	1,15	0,83	1,37	0,88
TPD52L2	AF004429	2,51	1,14	0,50	0,36	0,68	0,53	1,01	0,19
TPT1	NM_003295	1,46	0,12	0,96	0,51	2,12	1,34	0,89	0,03
TRAP1	NM_004257	3,71	3,04	5,43	3,16	0,65	0,72	0,55	0,25
TREM1	NM_018643	1,68	0,98	1,71	1,78	0,95	0,11	1,29	0,70
TREM2	BC032362	1,95	0,38	2,34	2,17	0,48	0,50	1,02	0,16
TRIM2	NM_015271	7,21	2,82	1,11	0,37	0,91	1,20	1,49	0,81
TRIP8	L40411	6,57	4,38	7,89	12,87	1,00	0,93	0,68	0,35

Name	GenBank ID	TNF MW	TNF STDAW	SE+TNF MW	SE+TNF STDAW	LPS MW	LPS STDAW	SE+LPS MW	SE+LPS STDAW
USP20	NM_006676	2,16	0,56	1,96	1,51	0,71	0,65	0,71	0,09
VAMP2	XM_008570	3,51	1,20	1,03	0,30	0,56	0,40	1,02	0,20
VCAM1	NM_001078	2,91	2,90	1,34	0,40	1,75	1,80	0,65	0,11
VIL2	NM_003379	3,18	2,10	1,03	0,37	0,60	0,36	0,89	0,11
WHSC1L1	NM_017778	3,99	3,01	0,77	0,54	0,91	0,74	0,65	0,03
ZFP36L2	U07802	1,29	0,13	0,86	0,48	1,16	0,38	0,73	0,11
ZNF220	XM_038544	3,63	3,10	1,25	0,22	0,73	0,81	0,63	0,16

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralf Claus für die Überlassung des Dissertationsthemas und die kontinuierliche fachliche Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche. Seine wertvollen Ratschläge, konstruktive Kritik und andauernde Motivation waren eine entscheidende Hilfe bei der Niederschrift der vorliegenden Arbeit.

Es war schön, dass Du Dir die Zeit genommen, und meine Arbeit durch hilfreiche und kritische Anregungen begleitet und unterstützt hast.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Bauer danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation vor der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu vertreten.

Spezieller Dank gilt dabei Frau Brigitte Specht und Frau Edith Walter, die mir bei der praktischen Durchführung der Versuche immer hilfsbereit und motivierend zur Seite standen.

Von ganzen Herzen danke ich meinen Freunden, die immer da waren, mir Zuspruch, Rückhalt und Anregungen gaben und ohne die diese Arbeit wohl besonders gegen Ende niemals fertig gestellt worden wäre. Herzlichen Dank für Lob, Kritik, Geduld und Aufmunterung in den jeweils passenden Momenten!

Meinen Eltern möchte ich für ihre stete, liebevolle Unterstützung, fortwährende Ermutigung und Ihr Vertrauen in all den Jahren des Studiums danken. Ihre moralische und oft auch finanzielle Unterstützung haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Abschließend ein herzliches Dankeschön auch an alle anderen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen haben.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich Prof. Dr. med. M. Bauer sowie PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf A. Claus bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskripts unterstützt hat,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe
- keine Strafverfahren gegen meine Person eingeleitet wurden.

Rostock, 27. August 2010

Lars Berbig